

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

10

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ulises Hernández Chiñas

FECHA: 9/sep/02

FIRMA: [Signature]

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE UNA
PROTEÍNA SECRETADA POR *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

ULISES HERNÁNDEZ CHIÑAS



Septiembre de 2002

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de julio de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Hernández Chiñas Ulises**, con número de cuenta 99809638, y número de expediente 3991042, con la tesis titulada: "Caracterización biológica de una proteína secretada por *Escherichia coli* enteroagregativa", bajo la dirección de la M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos.

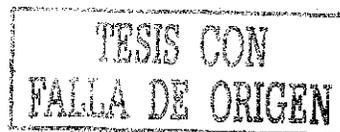
Presidente:	Dr. Alejandro Rafael Cravioto Quintana
Vocal:	Dra. María Teresa Estrada García
Secretario	M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos
Suplente:	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Suplente:	Dr. Jorge Mateo Villaseca Flores

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de septiembre de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



Dedico este trabajo con todo cariño a Dios
y a mis mis padres Onelia Chiñas Petriz y
Eusebio Hernández Toledo por
darme la oportunidad de disfrutar
de la vida. Gracias por todo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

A mi hermano Oziel por su apoyo y comprensión.

A mi abuelita Tita por su cariño y ejemplo.

A mis tias Elda, Lupe, Toyita, Cata, Elba, Angela y Tere, por el cariño que nos une.

A Juan Manuel, Sra Socorro y Lupita por considerarme parte de su familia.

A mis amigos Joaquin Tay, Raúl Cortes, Ramiro Moreno y Jaime Galindo por estar siempre conmigo en todos los momento.

A mi hermana Lulu y la Sra. Gloria, por brindarme su apoyo en todo momento.

A mi ahijado Oscar N. Gomez y mis amigos Maricela y Angel por su amistad y confianza.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos A. Eslava Campos, por su apoyo en la dirección y realización de esta tesis.

Al Dr. Alejandro R. Cravioto Quintana por su apoyo y su oportuna sugerencia de este trabajo.

Al Dr. José Manuel Hernández Hernández, por sus comentarios y observaciones en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge M. Villaseca Flores, por sus comentarios y apoyo técnico en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Estrada por sus sugerencias y comentarios en la realización de esta tesis.

A la Dra. Clara Espitia por sus observaciones y sugerencias en la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández por sus comentarios y su valiosa ayuda en la secuenciación de esta proteína.

Al Dr. H. Angel Manjarrez Hernández y M en C. Sandra Gavilanes por sus sugerencias y ayuda en la purificación de esta proteína.

Al M en C. José Molina López por su apoyo en la proporción de células en cultivo para el ensayo de toxicidad de proteínas bacterianas.

Al M. en C. Armando Navarro por su apoyo en el aislamiento y conservación de las cepas utilizadas en este estudio.

Al M en C. Luis Manuel Perea Mejía por su apoyo en la parte de análisis de la secuencia de aminoácidos de la Proteína.

A la Q.I. Maritoña Ramírez Pérez por su apoyo técnico en la escritura de esta tesis.

A todo el personal del departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina UNAM.

RESUMEN

Pic (Proteína Involucrada en la Colonización), es una serina proteasa secretada por *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) y *Shigella flexneri* 2a, la proteína tiene un peso molecular de 114 kDa, posee actividad de mucinasa y capacidad para degradar el complemento. Estudios previos señalan que las cepas EAEC productoras de Pic se han relacionado con cuadros de diarrea con sangre y diarrea aguda. Esta proteína pertenece a la familia SPATEs (Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae), proteasas que se han relacionado con virulencia. Pic presenta homología con proteínas de la familia como Pet y la hemoglobina proteasa (Hbp) que son secretadas por EAEC y EB1 (*E. coli* de origen humano) respectivamente. **Objetivo:** determinar la actividad biológica de Pic considerando las propiedades descritas para Pet y Hbp. **MATERIAL Y MÉTODOS** La proteína Pic se purificó a partir de la clona P56, para determinar su secuencia aminoterminal y evaluar su actividad biológica. La actividad citotóxica de la proteína se analizó en 4 líneas de células epiteliales en cultivo (HEp-2, Hela, Vero y CHO). Membranas purificadas de eritrocitos se inocularon a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de Pic para determinar la capacidad de Pic para degradar la espectrina. Hemoglobina de origen humano y de bovino se inocularon a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de la toxina para evaluar la capacidad de Pic para romper sus cadenas alfa y beta. Con anticuerpos anti Pic y PMSF (inhibidor de serina proteasa) se realizaron ensayos de neutralización e inhibición del efecto sobre la hemoglobina. Para buscar un probable receptor del complejo Pic-hemina se utilizaron proteínas de membrana externa de diferentes bacterias. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.** La proteína se obtuvo pura después de diferentes tratamientos. Al analizar la secuencia de aminoácidos de Pic purificada, se encontró que esta correspondía con la reportada previamente en el Gene Bank (AF097644). El ensayo de actividad citotóxica; Pic solo era activa a concentraciones altas. Aunque Pic indujo degradación de la espectrina, el efecto fue moderado, y solo con concentraciones altas (10 µg) y en tiempos prolongados de incubación (12 horas). En el ensayo con hemoglobina, Pic rompió la hemoglobina en sus cadenas α y β a tiempos cortos (una hora) con una concentración de 1.25 µg efecto semejante al inducido por Hbp. La actividad de Pic sobre la hemoglobina fue inhibida con PMSF, lo que confirma que el motivo de serina proteasa es el sitio activo de la proteína. Se identificó en una proteína de membrana externa probablemente de aproximadamente 20 kDa la cual podría ser el receptor del complejo Pic-hemina. Los resultados obtenidos muestran que Pic presenta actividad biológica diferente a la que se ha descrito en Pet, sin embargo, comparte propiedades con Hbp. Esta última característica podría relacionarse con un mecanismo alternativo de EAEC para la captura de hierro, propiedad que en conjunto con los que previamente se han descrito para Pic contribuye a la participación de la proteína en la colonización de EAEC.

CONTENIDO

CAPITULO	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
IV. OBJETIVOS	19
V. HIPÓTESIS	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
VII. RESULTADOS	42
VIII. DISCUSIÓN	52
IX. REFERENCIAS	60

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Las diarreas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México. La Encuesta Nacional de Salud realizada entre 1985 y 1990, reportó que en México se presentan de 100 a 110 millones de eventos diarreicos al año, con una incidencia de cuatro episodios al año en menores de cinco años y de uno en los de mayor edad (Dirección General de epidemiología 1980-1992). El estudio muestra además que en el 9.2% de las diarreas estudiadas existe la evidencia de sangre en heces, 9.2% de los niños presentaron diarrea persistente, y el 81.3% diarrea aguda líquida.(SSA. 1988)

Diferentes estudios epidemiológicos señalan la participación de las enterobacterias como agentes etiológicos de la diarrea; entre los más importantes se encuentran *Salmonella*, *Shigella*, *Campyobacter* y en una alto porcentaje *Escherichia coli*. (Cravioto y cols 1987, Sepulveda y cols. 1990)

***Escherichia coli*. AGENTE CAUSAL DE DIARREA**

***Escherichia coli* (*E. coli*)** es uno de los principales agentes bacterianos relacionados con la etiopatogenia de la diarrea tanto en países industrializados como en aquellos en proceso de desarrollo (Levine y cols, Nataro y cols 1998)

Theodore Escherich, bacteriólogo alemán, fue quien primero describió a esta bacteria a la cual denominó *Bacterium coli commune*. El primer aislamiento del microorganismo lo realizó de las heces de un infante sano, sin embargo, desde sus primeras observaciones propuso la posible participación de la bacteria en la producción de diarrea. Lo anterior, sin embargo, no se aceptaba por el hecho de que el microorganismo se aislaba tanto de las heces de niños sanos como de aquellos con cuadros clínicos de diarrea. La participación de la bacteria como responsable de infecciones extraintestinales también fue señalado por Escherich quien observó que frecuentemente era responsable de infecciones urinarias principalmente en niñas (Wasterson y cols. 1991).

No obstante que la primera descripción de la bacteria ocurrió en el siglo XIX, fue hasta finales de la década de los años cuarenta de la pasada centuria en que se

pudo establecer plenamente la participación de *E.coli* como patógeno causante de diarrea.

De acuerdo al manual de Bergey's el microorganismo forma parte de la familia *Enterobacteraceae* dentro de la tribu *Escherichieae*; la cual incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella*. El género *Escherichia* comprende las especies de *E. coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii*. Por técnicas de hibridación del DNA se ha logrado establecer que los géneros *Shigella* y *E. coli* están relacionados estrechamente, sin embargo, la separación entre las dos especies se ha mantenido principalmente por razones prácticas. *E coli* es la especie del género que mejor se conoce en relación a su capacidad patógena, las 4 especies restantes se están estudiando para determinar su participación en la producción de enfermedad (Brenner y cols, 1978; Farmer y cols, 1985; Krieg y cols, 1984)

E. coli de la biota normal del intestino participa de manera importante para el correcto funcionamiento fisiológico del mismo. Sin embargo, no obstante el importante papel que tiene la bacteria para mantener la homeostasis del organismo, hay clonas patógenas causantes de enfermedad (Nataro and Kaper, 1998b). Debido a características propias de la bacteria como son, varios factores de virulencia, que ocasionan diversos síndromes clínicos, su variada distribución

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

epidemiológica, y la diversidad antigénica, se ha agrupado a *E. coli* en diferentes tipos patogénicos. Las categorías de *E. coli* causante de diarrea actualmente aceptadas son: *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC)

CAPITULO II

ANTECEDENTES

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) se define como una bacteria que se adhiere a células HEp-2, en un patrón en el cual las bacterias se adhieren a células apilándose y formando agregados tanto en el citoplasma como en la superficie del vidrio de la preparación (Nataro y cols, 1985). El patrón de adherencia a células HEp-2 diferente al localizado y difuso, descritos previamente (Scaletsky y cols, 1984), en conjunto con información epidemiológica, que señalaba la asociación entre *E. coli* con adherencia agregativa, y con cuadros de diarrea principalmente en niños (Cuadro 1), dio lugar a que se integrara en el grupo de cepas causantes de diarrea (Bhatnagar y cols, 1993, Nataro y cols, 1998a).

La importancia de EAEC como responsable de diarrea se ha descrito principalmente en países en desarrollo. En la India se han reportado al menos seis

estudios que incluyen pacientes hospitalizados con diarrea persistente (Bhan, 1989) pacientes que visitaron clínicas de salud (Bhatnagar y cols, 1993) y casos de diarrea esporádica detectada en casas con hacinamiento.

En el continente americano específicamente en Brasil, se ha asociado a EAEC con 68% de los casos de diarrea persistente (Fang y cols, 1995), en México (Cravioto y cols, 1991), en Bangladesh (Henry y cols, 1996) y en Chile (Nataro y cols, 1987) se le ha asociado además con casos de diarrea esporádica

Estudios recientes señalan que EAEC también se ha aislado en muestras de heces de pacientes de países industrializados. En Alemania (Huppertz y cols, 1997), España (Vila y cols, 2000) y el Reino Unido (Chan y cols, 1994; Knutton y cols, 2001) existen reportes de su participación en cuadros de diarrea del viajero en brotes de diarrea.

CUADRO 1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO ASOCIADO A *E. coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC) CON DIARREA ($p < 0.05$)

SITIO	SÍNDROME	CASOS DE EAEC vs CONTROLES	COMENTARIOS
Santiago de Chile	Todas las diarreas	84 (33%)/253 vs 20(15%)/134 ^a	Comunidad y hospitalares Primera descripción de EAEC
Anapur-Palla, India	Diarrea persistente	18(30%)/61 vs 20(10%)/201 ^b	Casas asinadas de niños ≤ 3 años, primera asociación de EAEC con DP
Nueva Deli, India	Diarrea persistente	18(20%)/92 vs 6(7%)/92 ^b	Estudio de caso-control de DP en niños ≤ 2 años
Fortaleza, Brasil	Diarrea persistente	8(20%)/40 vs 2(5%)/38 ^b	Niños ≤ 5 años que vivían en casa asinadas
Morelos México	Todas las diarreas, Diarrea persistente.	78(12%)/636 ^a y 29(51%)/57 ^b vs 5(5%)/100	Niños ≤ 2 años que vivían en casa asinadas.
Mirzapoor, Bangladesh.	Diarrea persistente	17(27%)/62 vs 5(18%)/28 ^c .	Niños ≤ 6 años que vivían en casa asinadas. EAEC fueron aisladas los primeros dos días del episodio.
Fortaleza, Brasil	Diarrea persistente	8(20%)/40 vs 2(5%)/38 ^b	Pacientes \leq de 29 meses con DP
Nueva Deli, India	Todas las diarreas	9(21%)/42 vs 4(4%)/107 ^b	Niños ≤ 4 años referidos en un hospital
Calcuta, India	Diarrea Aguda	17(11%)/159 vs 3(2%)/174 ^d	EAEC asociados con diarrea aguda secretor a en pacientes pediátricos hospitalizados
Teran, Irán	Todas las diarreas	9(32%)/309 vs 17(17%)/100 ^a	Pacientes pediátricos EAEC resistente a antibióticos de amplio espectro
Fortaleza, Brasil	Diarrea persistente	38(68%)/56 vs 13(31%)/42 ^b	Pacientes ≤ 3 años
Vellore, India	Diarrea aguda	60(8%)/794 vs 22(4%)/566 ^a	Pacientes ≤ 3 años con diarrea ≤ 3 días
Wurzberg, Alemania	Todas las diarreas	16(2%)/798 vs 0/580 ^a	Niños hospitalizados ≤ 16 años Primer reporte de EAEC en un país industrializado.
Caracas, Venezuela	138(27%)/513 vs 36(15%)/241 ^a	138(27%)/513 vs 36(15%)/241 ^a	Pacientes ≤ 2 años con diarrea ≤ 3 días. EAEC solo es asociado en niños ≤ 2 años.
Lwiro, Zaire	Todas las diarreas	29(25%)/115 vs 3(8%)/34 ^a	Pacientes ≤ 5 años Primer reporte de EAEC en África.

^aTodas las diarreas vs sintomáticos

^bDiarrea persistente (DP) vs sintomáticos

^cDiarrea persistente vs diarrea aguda

^dDiarrea secretora vs diarrea invasiva

James P. Nataro, *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, 4:251-260

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BROTOS DE DIARREA POR EAEC.

El primer reporte de un brote de diarrea por EAEC en el que se vieron afectados 19 niños se observó en un cunero en Nis, Serbia en 1995 (Cobeljic y cols, 1996). En doce de los 19 niños afectados se aislaron cepas EAEC del serogrupo O4 resistentes a múltiples drogas. La diarrea persistió de 3 a 9 días en 16 bebés, y en tres de ellos se prolongo hasta por 20 días, además en tres de los niños se observó moco en las heces.

Eslava y cols (1993), refieren dos brotes de diarrea persistente en un cunero del Instituto Nacional de Pediatría. Cinco de los 12 niños afectados y en los que se le aisló EAEC murieron a consecuencia de la enfermedad. El estudio post-mortem de estos niños mostró lesiones necróticas de la mucosa del íleon.

En Junio de 1996, se reporto un brote de diarrea a causa de EAEC en una villa al sur de la India, la fuente de infección se asoció con pozos de agua que se encontraban abiertos, sin embargo, la bacteria no pudo ser aislada de estos sitios (Pai y cols, 1997).

En Giju, Japón (1993), se presentó un brote que afectó 2,697 niños de 16 escuelas después de haber consumido desayunos escolares contaminados con EAEC. El

serotipo identificados en las heces de los niños fue O? H10, sin embargo la bacteria no fue aislada de los desayunos analizados (Itoh y cols, 1997).

Cuatro brotes de diarrea en adultos causada por EAEC fueron reportados en el Reino Unido. La cepa implicada fue del serotipo O44:H18, esta se aisló de la red de agua de un centro de convenciones (Smith y cols, 1994)

CUADRO 2. BROTES DE DIARREA A CAUSA DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

REPORTE	PACIENTES	ENFERMEDAD
Cunero; Nis, Serbia, 1995	19 niños	Diarrea acuosa
Inglaterra, 1994	51 adultos	Diarrea acuosa por 3-7 días
Inglaterra, Hotel, 1994	53 adultos	Diarrea acuosa por 68 h.
Villa al sur de la India, 1996	20 niños	Diarrea acuosa, duración 11 días.
Cunero, México D.F	No reportados	Diarrea severa; 5 muertes
16 escuelas, Gifu, Japón	2,697 niños escolares	Diarrea, algunos casos

James P. Nataro, *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, 4:251-260.

Poco se conoce con respecto a los mecanismos de patogenicidad de EAEC, involucrados en la patogénesis de los cuadros clínicos que desencadena. Estudios realizados por Knutton y cols (1992), mostraron que estas bacterias expresan cuatro tipos morfológicos diferentes de fimbrias, por medio de los cuales se adhieren a la mucosa del colon humano. Estas fimbrias fueron llamadas HR (varas

huecas), R (varas), F (fimbrias finas) y FB (haces fibrilares), estas últimas han sido observadas con mayor frecuencia en las cepas EAEC. Nataro y cols (1992) identificaron fimbrias con diámetro de 2 a 3 nm designadas como Fimbria de Adherencia agregativa I (AAF/I). Los genes para la expresión de la fimbria están organizados en dos grupos separados dentro de un plásmido de 60 MDa. El análisis de la secuencia de la región 1 sugiere que AAF/I es miembro de la familia de adhesinas Dr, denominadas así por adherirse al antígeno del grupo sanguíneo Dr. En la región 2 se encontró un factor transcripcional para la expresión de AAF/I, el cual presenta homología con proteínas de la familia AraC.

Sin embargo, utilizando ensayos en microscopía electrónica y sondas de DNA Nataro y cols., encontraron que sólo una minoría de cepas EAEC expresan AAF/I.

Una segunda fimbria llamada AAF/II, la cual es diferente tanto morfológica como genéticamente a AAF/I, fue identificada. Los genes de la fimbria AAF/II se encuentran en dos regiones separadas por 15 kb, típico de las fimbrias. La importancia de las AAFs en enfermedades humanas no ha sido demostrada, sin embargo, se propone que juega un papel importante en la adherencia a la mucosa ya que mutantes en AAF/II son incapaces de adherirse por largo tiempo (Czeczulin y cols, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hicks y cols (1996) utilizaron un modelo *in vitro* de cultivo de órgano para estudiar el fenómeno de adherencia de EAEC, en este observó que las bacterias se embeben en el moco, formando una película. La habilidad de estas bacterias para adherirse a la mucosa ha sido demostrada *in vitro* y en voluntarios retados con cepas EAEC que desarrollaron diarrea (Nataro y cols, 1995).

El examen histopatológico del tejido intestinal de cerdos gnotobióticos retados con cepas EAEC de origen humano, mostró la presencia de un gel mucoide cercano a la zona de adherencia de la bacteria en el intestino delgado. El análisis de este gel reveló la presencia de un gran número de bacterias agregativas densamente empaquetadas. Cercano al epitelio intestinal se observó la abertura de células caliciformes, sugiriendo un proceso de hipersecreción de moco, además de hiperemia moderada de la porción distal del intestino delgado y ciego (Tzipori y cols, 1992)

La formación de la película de moco y la adherencia, sugiere la probable participación en el daño a la mucosa intestinal. Vial y cols (1988) inocularon cepas de EAEC vivas en asas ligadas de la porción ileal del intestino de conejos y ratas, demostraron que las bacterias dañaban al epitelio de manera semejante al inducido por cepas de otros grupos de *E coli*, utilizadas en los mismos modelos animales. El daño resultante del reto con EAEC mostró acortamiento y necrosis

hemorrágica de las vellosidades intestinales, asociado a una respuesta inflamatoria intermedia con edema e infiltración de la submucosa

La producción de moco también se ha observado en necropsias de íleon de niños que fallecieron como resultado de la infección natural de EAEC (Eslava y cols, manuscrito en preparación), y en un estudio en voluntarios retados con cepas EAEC (Nataro y cols, 1995).

Nataro y cols, (1996.) refieren que la cepa EAEC O42 (O44.H18) induce un efecto citotóxico sobre células T-84 en cultivo (Células de carcinoma intestinal humano). Ellos observaron vesiculación de las microvellocidades intestinales, seguida por muerte celular y exfoliación de las células de la monocapa. Este efecto fue acompañado por el incremento en la formación de vacuolas y la separación del núcleo alrededor del citoplasma. El efecto se presentó principalmente en el área en la que la bacteria se adhería a las células T-84.

Todas las observaciones anteriores permiten proponer que el daño pudiera estar relacionado con la producción de factores con actividad tóxica. No obstante que las lesiones histopatológicas observadas son similares a las causadas por cepas EHEC, al realizar ensayos de hibridación con sondas específicas para identificar bacterias productoras de SLT-I (Shiga-like toxin I) y SLT-II (Shiga-like toxin II), no

hubo reconocimiento de DNA en ninguna de las cepas EAEC (Levin y cols, 1987; Vial y cols, 1988).

Savarino y col (Savarino y cols, 1991, y 1993) al estudiar el plásmido de la cepa EAEC 17-2, identificaron un fragmento de DNA con un marco de lectura abierto de 4.1 kDa. La expresión de este gen corresponde a un peptido de 30 aminoácidos de aproximadamente 10 kDa. Utilizando el modelo de cámaras de Ussing que mide la conductividad eléctrica de las células, se observó que el peptido inducía incremento tanto en la corriente de corto circuito (Isc) como en la diferencia de potencial (PD), sin alteración en la resistencia, lo que se sugirió que el compuesto era una enterotoxina. Savarino y cols. (1991) encontraron que el peptido de 30 aminoácidos identificado en EAEC tenía homología con la toxina ST de *E. coli* enterotoxigenica, por lo anterior lo llamaron toxina termoestable de *E. coli* enteroagregativa (EAST1). EAST1 se ha identificado en el 40% de las cepas EAEC, sin embargo, se ha encontrado con la misma frecuencia en cepas de pacientes con cuadros de diarrea que en los de las personas sanas (Nataro y cols, 1998b). Por otro lado, también se ha observado que cepas de otros grupos de *E. coli*, y en particular de EHEC elaboran EAST1, también ha sido reportado que la toxina se identifico en el 38% de cepas *E. coli* no patógenas (Savarino y cols, 1996).

Baldwin y cols (1992), describieron una proteína de 120 a 140 kDa obtenida del sobrenadante del cultivo de diferentes cepas EAEC. Esta proteína presentó reactividad inmunológica cruzada con la hemolisina alfa producida por cepas *E. coli*. Al realizar ensayos sobre cultivos de células HEp-2, los autores observaron que se inducía un incremento en los niveles intracelulares de calcio, efecto relacionado con daño al citoesqueleto de las células.

Eslava y cols (1993), reportaron que cepas EAEC elaboraban dos proteínas con peso molecular aproximado de 116 y 108 kDa respectivamente. Ambas proteínas fueron reconocidas tanto por el suero de niños infectados naturalmente como por el de voluntarios retados con cepas EAEC. El empleo del modelo de asa ligada de intestino de rata, inoculadas con ambas fracciones proteicas permitió observar que estos inducían lesiones intestinales de tipo hemorrágico-inflamatorio, similares a las identificadas en el intestino de niños fallecidos a consecuencia de diarrea severa asociada con el aislamiento de cepas EAEC.

Los hallazgos de Eslava y cols, sugieren que alguno de estos componentes (116 y 108 KDa) secretados por diferentes cepas EAEC, pudieran ser el o los responsables del daño intestinal y de la diarrea consecuente, desencadenada por la infección de este grupo bacteriano.

En un estudio en el que se analizó la expresión de estas proteínas en cepas EAEC aisladas de niños con diarrea y sin diarrea en México (Hernández y cols, 2001), se encontró que en los niños sin diarrea solo 2/43 (4.6%) y 5/43 (11.6%) producían las proteínas de 116 y 108 kDa respectivamente. Con relación a las cepas de niños con diarrea se observó que 37% expresaron la proteína de 116 kDa y 30% la de 108 kDa. El análisis estadístico de estos resultados, mostró diferencia significativa al remplazar entre las cepas EAEC aisladas de niños con diarrea y los de los controles observándose una $P=0.0001$ para la proteína de 116 kDa y $P=0.027$ para la de 108 kDa. Un análisis similar, pero en cepas EAEC aisladas de niños con diarrea con presencia de sangre, mostró diferencia estadística significativa ($P=0.0002$) únicamente en la producción de la proteína de 116 kDa.

El gen que codifica para la proteína de 108 kDa se identificó en el plásmido de virulencia de 65 MDa de EAEC (pAA), por lo que se denominó a la proteína **Pet** (**P**lasmid **e**ncoded **t**oxin) (Eslava y cols, 1998). Con respecto a la información genética de la proteína de 116 kDa se identificó que esta se encuentra en el cromosoma de la bacteria. A esta proteína por tener actividad de mucinasa se le asoció con la colonización intestinal de la bacteria por lo que se le asignó el nombre de **Pic** (**P**rotein **i**nvolved **i**n **c**olonization) (Henderson y cols, 1999). Al realizar el análisis de ambos genes (Pet y Pic) se observó que presentan una alta

homología con la familia de proteínas autotransportadas perteneciente a una subfamilia con un motivo de serina proteasa conservado (GDSGSP), por lo que se conocen como SPATES (*Serin Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*) (Henderson y cols, 1998) clasificadas en el sistema de secreción de tipo V de bacterias Gram negativas (Henderson y cols, 2001)

Estudios sobre la actividad biológica de Pet mostraron que esta proteína induce efecto citopático sobre células en cultivo HEp-2 y HT29 C1, caracterizadas por la liberación de las células de la superficie de contacto, redondeamiento, contracción del citoesqueleto y liberación de fibras de estres de actina (Navarro-Garcia y cols, 1999), En el modelo de Cámara de Ussing, Pet indujo efectos citotóxicos y enterotóxicos (Navarro-Garcia y cols, 1998), actividad que depende del motivo de serina proteasa. Villaseca y cols (2000), demostraron que al agregar la toxina Pet a membranas de eritrocitos de carnero y a células HEp-2 purificadas, el blanco de Pet es la espectrina y su homólogo la fodrina, cuyo efecto es la degradación de las cadenas α y β , dicha actividad también se relaciona con el motivo de serina proteasa.

Pic la otra proteína de EAEC tiene una identidad del 99.7% con ShMu, mucinasa secretada por *Shigella flexneri* 2a. Además de la actividad de mucinasa, Pic y

ShMu inducen resistencia al suero y aglutinan débilmente eritrocitos de algunas especies (rata, cerdo, conejos, cobayo y cuyo) pero no con eritrocitos de pollo y humano (Henderson y cols, 1999).

Pic aunque en menor proporción, también tiene homología con SepA, EspC, EspP, Pet y Tsh (Henderson y cols, 1999). Tsh tiene identidad del 99% con Hbp que es una hemoglobina proteasa de alto peso molecular, identificada en la cepa patógena de *E. coli* de origen humano EB1. Hbp y Tsh solo difieren en dos aminoácidos (Q290K y A842T). Se ha propuesto que Hbp se une al grupo hemo después de degradar la hemoglobina, y utiliza este mecanismo para la captación del hierro (Otto y cols, 1998).

En humanos la mayor parte del hierro se encuentra localizado intracelularmente en forma de ferritina, hemoglobina o el grupo hemo (Mietzner y cols, 1994). En *E. coli* se han identificado pequeñas proteínas llamadas sideroforos implicadas en el transporte de hierro. Los sideroforos son semejantes a la aerobactina y enterobactina proteínas que compiten por el hierro con transferrina y lactoferrina (Crosa y cols, 1989). El usar el grupo hemo como una fuente de hierro ha sido considerado como un determinante de virulencia en diferentes cepas de *E. coli*.

CAPITULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

EAEC es un patógeno intestinal causante de diarrea, el mecanismo de patogenicidad, es desconocido. Existen varios marcadores de virulencia de la bacteria, entre estos se han descrito toxinas con diferentes propiedades. Pic y Pet, son serinas proteasas de alto peso molecular que pertenecen a la subfamilia SPATEs. Pet cuya codificación antigénica esta en el plásmido induce reareglos del citoesqueleto asociados con la disrupción de la fodrina o su homologo la espectrina, con respecto a Pic esta se encuentra en el cromosoma tanto de EAEC como de *Shigella flexneri* 2a. Estudios previos muestran que Pic tiene actividad de mucinasa e induce resistencia al suero. En un estudio epidemiológico realizado en el laboratorio se encontró que las cepas de EAEC que producían Pic se asociaban más frecuentemente con cuadros de diarrea con sangre. La explicación al respecto es desconocida, por lo que consideran importante investigar si esta proteasa tiene propiedades que expliquen su asociación con dicho tipo de diarrea.

CAPITULO IV

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si Pic presenta actividad biológica semejante a la descrita en Pet y Hbp.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar Pic y determinar su secuencia amino terminal
- Determinar el punto isoelectrico de Pic
- Determinar si Pic induce efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares en cultivo
- Evaluar la capacidad de Pic para degradar espectrina
- Analizar el efecto de Pic sobre hemoglobina
- Obtener anticuerpos policlonales de conejo contra Pic para neutraliza las actividades biológicas indentificadas
- Buscar un posible receptor de membrana externa de la bacteria para el complejo Pic-hemina

CAPITULO V

HIPÓTESIS

Pic es una serina-proteasa de cepas EAEC que degrada la hemoglobina, actividad biológica que se relaciona con los cuadros clínicos de diarrea acuosa con sangre inducidos por la bacteria.

CAPITULO VI

MATERIALES Y MÉTODOS

BACTERIAS

Se utilizó la cepa pPic (P56) clona mínima de expresión de Pic, la cual fue donada por el Doctor Ian R. Hederson (Departments of Pediatrics and Microbiology and Immunology, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland). Se utilizó además la cepa HB101 (K12) como control negativo para los diferentes ensayos realizados.

Las cepas se conservaron en gelosa especial con 12 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, (base de gelosa sangre, agar bacteriológico, extracto de carne pH de 7.4) La pureza de las mismas se comprobó cada vez antes de su uso, por siembra en gelosa sangre

y agar Mc Conkey de donde se tomo una colonia para los diferentes ensayos realizados.

RENDIMIENTO DE Pic EN CALDO LURIA.

Para la obtención óptima de la proteína Pic, la cepa P56 fue cultivada en matraces con 200 ml de caldo Luria [Bacto triptona (10 g), extracto de levadura (5 g), NaCl (10 g/l)] y se ajusto el pH a 7.0. Se utilizó diferentes extractos de levadura (Merk ó Bioxon) con y sin tetraciclina (12 µg de tetraciclina por ml). Los matraces se incubaron 18 h. a 37 °C en agitación continua a 150 r.p.m (New Brunswick Scientific). El cultivo bacteriano obtenido se centrifugo a 12,000 g (8,000 r.p.m.) durante 30 min a 4 °C (Beakman rotor JA-10), el paquete bacteriano se descarto y el sobrenadante se sometió a precipitación con sulfato de amonio al 75% de saturación durante 18 h en reposo (4 °C). El precipitado se recupero centrifugando a 12,000 g (8,000 r.p.m) a 4°C durante 30 min. Se resuspendió y dializó contra una solución amortiguada de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2 (Green y cols, 1955)

PURIFICACIÓN DE Pic

La cepa P56 se cultivo en caldo Luria [Bacto triptona de DIFCO (10 g), extracto de levadura de Bioxon (5 g), NaCl de Merck (10 g) por cada litro] y se ajusto el pH a 7.0. Se preparo un preinóculo sembrando las bacterias en tubos con 3 ml del caldo Luria, los tubos se incubaron en agitación (New Brunswick scientific) a 150 rpm durante 4 h a 37 °C. De este preinoculo se pasaron 200 µl a matraces conteniendo 200 ml del medio de cultivo. Estos matraces fueron incubados a 37 °C por 18 h en agitación continua (150 r.p.m); posteriormente fue centrifugado y el sobrenadante precipitado con sulfato de amonio como fue descrito anteriormente.

El precipitado obtenido se fraccionó con una solución de fosfato de potasio 3.5 M pH 6.8 (K1/K2) (Bizzini y cols, 1969), a una concentración final de 1.15 M durante 18 h (4 °C). El precipitado se separo del sobrenadante mediante centrifugación a 12,000 g (4 °C) durante 30 min. El sobrenadante obtenido se dializó contra el amortiguador de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2.

El sobrenadante 1.15 M obtenido se sometido a cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose (Pharmacia Fine Chemical No. 17-0510-01), empleando una columna de 50 cm de largo por 1.5 cm de diámetro ajustando la velocidad de

flujo a 10 ml/h, para obtener fracciones de 5 ml (colector LKB). La columna se equilibro con amortiguador Tris-HCl 0.05M en EDTA 0.01 M a pH 8.0. Las fracciones proteicas retenidas por la columna de intercambio iónico se eluyeron aumentando la fuerza iónica del sistema con 0.5 M de NaCl (Murray y cols, 1990)

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford y cols, 1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar, realizando las lecturas en un lector para placas de ELISA (Microelisa Auto Reader a Dynatech. MR580) a 575 nm.

La primera y segunda fracción de elusión se sometió a cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono S HR 5/5 (Pharmacia Biotech 17-0547-01) en un sistema FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography Basic, con dos bombas P-500 Pharmacia, LKB). Para la separación se utilizaron las siguientes condiciones de corrimiento, 10 min del buffer A (0.05M Tris-HCl en 0.01 M EDTA) posteriormente un gradiente salino utilizando buffer B (NaCl 1 molar) en un tiempo de 40 min, manteniéndose al 100 % el buffer B por 20 min más. El flujo fue de 0.5 ml por minuto y se colectaron fracciones de 1 ml, el perfil de elusión se midió a 280 nm.

ELECTROFORÉISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

Las muestras obtenidas se analizaron por electroforéisis convencional de una dimensión bajo condiciones desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida al 10% con 0.1% de duodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) en presencia de beta mercaptoetanol (Ausubel y cols, 1987; Leammli y cols, 1970). Las dimensiones del gel separador fueron de 5.5 cm de altura por 0.75 cm de espesor (5 X 0.75) En cada pozo del gel se colocaron 20 µg de proteína (precipitadas con sulfato de amonio al 75% de saturación o al 1.15 M con Buffer de fosfato de potasio) ajustando a un volumen final de 35µl, en el caso de las muestras obtenidas de la cromatografía se colocaron 20µl de cada una de las fracciones Para el corrimiento se utilizó un voltaje constante, 100 para el gel concentrador y 200 para el separador, con un amperaje variable. El peso molecular de las fracciones se calculó al medir la migración de los marcadores de peso molecular conocido (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri) utilizados para tal propósito (Weber, 1969), posterior a la tinción del gel con azul de Coomassie R-250 (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri). En los ensayos de actividad de la hemoglobina proteasa de Pic se utilizó una electroforesis en condiciones no reductoras, bajo las mismas condiciones de corrimiento

SECUENCIA AMINO TERMINAL

Para asegurarnos que se trabajaba con la misma proteína reportada en el Genbank (No de acceso AF097644) por Henderson y cols (1999), se realizó la transferencia de la proteína Pic a una membrana de difluoruro polivinilo (PVDF) 0.2 μm (BIO-RAD 162-0184) (Towbin y cols, 1979), la proteína se visualizó tiñendo la membrana con rojo de ponceau, la banda correspondiente al peso molecular de Pic se mandó al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM para su secuenciación.

La secuencia N-terminal fue determinada por una degradación Edman automatizada sobre una fase de gas en un secuenciador de proteínas LF 3000; (Beckman instruments), equipado con una línea Beckman System Gold a un sistema de cromatografía de alta resolución (HPLC). El equipo de HPLC incluye un modelo de bomba 126 y un detector con una longitud de onda de 268 y 293 nm por señal y referencia, respectivamente. La columna fue Beckman Spherogel Micro PTH (2 por 150). Los reactivos estándar de secuenciación Beckman fueron usados para el análisis (Villaseca y cols, 2000)

ANTICUERPOS POLICLONALES

Inmunización de animales

Para obtener anticuerpos específicos contra la proteína en estudio, las fracciones que eluyeron en la primera fracción de la cromatografía en Q-sefarosa (Pharmacia fine Chemicals) se sometieron a SDS-PAGE en gradientes discontinuos (8 y 6% de acrilamida) (Ausubel y cols, 1987) La banda obtenida que correspondía a la proteína en estudio se visualizo con cloruro de potasio 0.1M para poder separarlo del gel sin que llevara contaminantes. El fragmento de poliacrilamida con la proteína correspondiente se homogeneizo utilizando una jeringa y pasándolo a través de agujas de diferente calibre para inocularla a los conejos. Se administraron cinco dosis por vía subcutánea en el dorso de dos conejos de raza Nueva Zelanda de 2 meses de edad, a intervalos de 15 días. Previa a la inmunización se tomo una muestra sanguínea de cada conejo y el suero obtenido se utilizó como testigo negativo.

Purificación de anticuerpos

Los conejos inmunizados y previa anestesia con éter, fueron exanguinados a blanco por punción cardiaca, la sangre obtenida se dejó coagular durante 3 h a temperatura ambiente, el coagulo formado se removió con un aplicador de madera, y los tubos se dejaron toda la noche a 4 °C para lograr la contracción del coagulo. Los tubos se centrifugaron a 1200 g. durante 30 min a 4 °C (Sorvall. Rt 6000D. Dupont) para recuperar el suero. La gamma globulina del suero se recupero precipitando con sulfato de amonio al 50% y 33% de saturación (Green y cols, 1955) Para eliminar el exceso de sulfato de amonio los precipitados obtenidos se dializaron contra PBS pH 7.4 a 4°C, efectuando dos cambios diarios durante 3 días. Los anticuerpos de clase IgG se obtuvieron empleando una columna de intercambio ionico (Q-sepharose) (Murray y cols, 1990).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (Western blot)

Se realizó la inmunotransferencia por el método de Towbin y cols (1979), utilizando 200 miliamperes (mAmp) constante y voltaje variable durante 3 h. Las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Millipore HAHY304F0)

posteriormente se lavaron con 0.01M Tris-HCl en 0.15 M NaCl pH 7.4 (TBS). Los espacios vacíos se bloquearon utilizando leche descremada al 5% en TBS seguido de 3 lavados con TBS conteniendo 0.05% Tween 20 (TBS-Tween). Para visualizar se empleó la gammaglobulina obtenida del suero de los conejos inmunizados contra Pic a una dilución 1:250 (en leche descremada al 5%) incubando a temperatura ambiente una hora en agitación. Al finalizar se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween. Para revelar la reacción se utilizó anti IgG de conejo marcada con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md) a una dilución de 1:3000 (en leche descremada al 5%), incubando una hora. Se lavó 3 veces más con TBS-Tween y finalmente se lavó una sola vez con 0.01M Tris HCl pH 6.8 (TB) durante 10 min. Para hacer visible la reacción se utilizó 4-cloro 1 naftol como sustrato (Sigma Chemical, St. Louis Missouri) más H₂O₂ (J.T. Backer). La reacción se paró con agua corriente una vez que aparecieron las bandas coloreadas.

PUNTO ISOELECTRICO

La proteína semipurificada (fracción obtenida de Q-sepharosa) se liofilizó y se resuspendió en la solución "A" de O'Farrel. (urea 9.5 M, NP-40 al 2%, β -mercaptoetanol al 5% y anfolinas pH de 3.5-10 al 2%).

La electroforesis bidimensional se realizó en geles de poliacrilamida de acuerdo al procedimiento descrito por O'Farrel (1975). La composición de los geles fue: Urea 9.16M, Acrilamida 3.7%, Bisacrilamida 0.2%, NP-40 al 2% y 5% de anfolinas de un rango de pH entre 3.5 a 10. La polimerización de los geles se catalizó al agregar persulfato de amonio y Temed a las concentraciones finales de 0.01% y 0.07% respectivamente. Durante la polimerización de los geles se pusieron 20 μ l de Urea 8M sobre la mezcla y se dejaron polimerizar por espacio de una hora. Después se reemplazó la Urea 8M por la solución "A" de O'Farrel y sobre esta se pusieron 10 μ l de agua desionizada. Al terminar la hora se agregaron las soluciones del ánodo y del cátodo. Para el cátodo se utilizó NaOH 0.02M desgasificada y para el ánodo H_3PO_4 0.01M. Tres geles cilíndricos se precorrieron 15 min a 200 voltios, 30 min a 400 voltios y 30 min a 600 voltios. En seguida se retiró la solución de NaOH y la solución A, y se aplicó la muestra de proteínas (100 μ g) a dos de ellos y sobre esta se adicionaron 10 μ l de solución K (Urea 9 M y anfolina 1%). La cámara se volvió a

llenar con NaOH 0.02M y la electroforesis se desarrolló a 600 voltios por 15 h y a 800 voltios por una hora.

Al final los geles se sacaron de los tubos por medio de presión de aire con una jeringa, a continuación los geles se equilibraron con 10 ml de solución de O'Farrel (Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y SDS al 2.3%) por una hora. Los geles que se utilizaron en la segunda dimensión se prepararon en las mismas condiciones que los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 10%)

Los geles cilíndricos se unieron al gel concentrador con la misma mezcla de poliacrilamida al 5%, adicionando una gota de buffer de corrida (Laemmli) como marcador del frente de migración

Uno de los geles se tiñó con azul de coomasie y el otro se utilizó para transferir las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore Co HAHY304F0) para posteriormente realizar una inmunodetección con anticuerpos específicos contra Pic, como fue descrito anteriormente

El gel cilíndrico sin muestra se corto en fragmentos de 1 cm y se colocó en una solución de cloruro de potasio al 1% para posteriormente medir el pH

OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE CARNERO.

Se utilizaron 30 ml de sangre de carnero estéril, a este se le adicionaron 5.3 ml de buffer de fosfato isotónico (310 mosM) mezclándolo suavemente por 10 min. Se centrifugó a 1200g por 10 min a 4 °C en tubos falcon de 50 ml, con una pipeta Pasteur se removió el plasma para obtener el botón de células rojas. Las células obtenidas se lavaron 2 veces con 20 ml de buffer isotónico mezclando por inversión suavemente, posteriormente se centrifugó durante 10 min. a 1200g (4 °C) El botón de células se suspendió en 5 ml de buffer isotónico y se le adicionó 25 ml de buffer de fosfato hipotónico (20 mosM) agitando suavemente la suspensión. El lisado obtenido se centrifugó a 20,000g por 40 min (4 °C). Se eliminó el sobrenadante y se lavo 5 veces más con buffer hipotónico seguido por una centrifugación a 20,000g por 20 min 4 °C. Después del último lavado el botón obtenido se resuspendió en 4 ml de buffer de fosfato isotónico (Hanahan, 1974). La concentración de proteínas de la muestra se determinó por el método de Bradford (Bradford y cols, 1976)

ACTIVIDAD DE Pic SOBRE MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE CARNERO

Las membranas de eritrocitos purificadas (10 μg) se incubaron con Pic (5 μg) ajustando el volumen a 100 μl con PBS pH 7.4. Se realizó una cinética de tiempo a las 3, 6, 12, 18 y 24 h. a 37 °C en agitación a 100 r.p.m. (New Brunswick Scientific), la reacción se detuvo al agregar buffer de Laemmli. En cada ensayo se emplearon como controles proteína Pic y por otro lado membranas de eritrocitos, sometidos a las mismas condiciones del ensayo.

Todas las preparaciones se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE al 6%) en geles de 14.5 cm por 12 cm. Las condiciones de corrida fueron 40 mA para el concentrador y 60 mA el separador. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 para observar las fracciones proteicas obtenidas

Para analizar el efecto de Pic sobre la espectrina (Villaseca y cols, 2000) se transfirieron las fracciones separadas sin teñir a una membrana de nitrocelulosa (Millipore Co.) durante 6 h a 200 mA. La reacción se visualizo utilizando anticuerpos de conejo preparados contra las cadenas α y β espectrina (Sigma Chemical Co.) a una dilución de 10^{-2} . Los anticuerpos anti IgG conejo obtenidos en

cabra (1 3000) conjugados con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md), se utilizaron para identificar la reacción; posteriormente se reveló bajo las condiciones descritas anteriormente.

ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN

Las fracciones purificadas de Pic (5 μ g) se pusieron en contacto con los anticuerpos específicos contra la proteína (10 μ g) durante 3 h a 37 °C. La mezcla se utilizó para tratar las proteínas purificadas de la membrana de eritrocitos de carnero, (10 μ g) incubando por 18 h a 37 °C en agitación constante 100 r.p.m (New Brunswick Scientific)

El efecto de neutralización se observó al analizar las preparaciones en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 6%. de 14.5 cm por 12 cm, teñido con azul de Coomassie.

La participación del motivo de serina proteasa, se evaluó mezclando la toxina con fenilmetilsulfonil fluoruro 2 mM (PMSF) (Sigma Chemical Co) y agregando ésta a 10 μ g de membranas de eritrocitos de carnero. La mezcla se ajustó a un volumen

final de 100 μ l, y se incubó a 37°C por 18 h. Transcurrido este tiempo se adicionó a la muestra 50 μ l de buffer de Laemmli para finalmente realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% SDS-PAGE que se tiñó con azul de Coomassie.

EFFECTO DE Pic SOBRE CULTIVOS CELULARES

Las monocapas de células HEp-2, HeLa, VERO y CHO cultivadas en placas de 96 pozos se inocularon con Pic a diferentes concentraciones. Previamente, las células se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM), suplementados con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (inactivado a 56 °C por 30 min), 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES 0.075% (p/v) de bicarbonato de sodio y una mezcla de antibióticos (penicilina, estreptomina a una concentración final de 100 U/ μ g/ml). Las células se crecieron en una atmósfera al 90% de humedad, en presencia de una mezcla de CO₂:O₂ (5%:20%, [v/v]) a temperatura de 37°C (Brown y cols, 1997).

Una vez obtenidas las monocapas con un 70% de confluencia las células se lavaron con PBS pH 7.4 estéril antes de ser tratadas con Pic. Previo al ensayo, la proteína purificada fue diluida en medio mínimo esencial sin suero y sin antibiótico a las concentraciones de 50, 25, 12.5, 10.0, 6.75, 5.0, 2.5, 1.25 μ g/ml en un

volumen final de 100 μ l . La toxina en las diferentes concentraciones se agregó a los pozos de cada una de las líneas celulares y se incubó a 37 °C en una estufa de CO₂. El efecto se analizó a las 0, 3, 6, 12, 18 y 24 h. (Villaseca y cols, 2000), finalmente las células se fijaron con metanol y se tiñeron en colorante de Giemsa.

ACTIVIDAD DE Pic SOBRE LA HEMOGLOBINA.

Para el ensayo de degradación de hemoglobina se utilizó la metodología propuesta para la proteasa Hbp (Otto y cols, 1998). Una mezcla que contenía 10 μ g de Pic purificada se mezcló con 10 μ g de la hemoglobina (hb) diluida en buffer de fosfato de sodio 0.1M pH 6.0, y se incubó por 4 h a 37 °C. Como controles se utilizaron hb (10 μ g) y Pic (10 μ g) sometiendo a las mismas condiciones. Para determinar el efecto de la concentración de la toxina se mezclaron 10 μ g de hb con 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1.25 μ g de Pic bajo las mismas condiciones de incubación. También se analizó la actividad de Pic sobre diferentes concentraciones de hb, para esto se mezclaron 10 μ g de toxina con 10, 20 y 30 μ g de hb. Se realizó una cinética de tiempo para evaluar el efecto inducido por Pic sobre la hb. En este ensayo se utilizaron 10 μ g de Pic que se mezclaron con la misma cantidad de hb, La mezcla se incubó a 37°C por a 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h, la reacción fue detenida

congelando las muestras. Con el mismo ensayo se evaluó la participación del motivo de serina proteasa de Pic sobre la actividad inducida en la hb. Para tal se utilizó PMSF (0.2 μ M) que se incubó con 10 μ g de Pic, esta mezcla se adicionó a 10 μ g de hb y se procedió de la forma descrita previamente. Las muestras se ajustaron a un volumen de 100 μ l con buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0. un volumen de 50 μ l de muestra se inyectó a un gel de poliacrilamida 10% en condiciones no desnaturalizantes. Para observar el efecto sobre la hemoglobina, los geles de poliacrilamida se incubaron con la solución de sustrato para quimioluminiscencia (Western blot Chemiluminescence Reagent Plus de NEN) por 1 min. Para evaluar la reacción se hizo un rociado de peróxido de hidrogeno (37%), e inmediatamente el gel se coloco sobre una película de rayos X (Fuji Film) dentro de un cassette de exposición con intensificador de imagen durante 10 segundos. Finalmente, se reveló la película y se observó la imagen obtenida. Un segundo gel con el mismo número y tipo de muestra se tiño con nitrato de plata.

UNIÓN DE Pic AL GRUPO HEMO

Por cromatografía de afinidad se analizó la especificidad de unión de Pic a la hemina. Concentraciones de 50, 40, 30, 20, 10 y 5 μ g de Pic diluidas en 100 μ l de

PBS fueron mezcladas con 100 μ l de agarosa hemina (Sigma Chemical). La mezcla fue incubada toda la noche a 4 °C. La agarosa-hemina fue colectada por centrifugación a 10,000 r.p.m. durante 5 min, y lavada 6 veces con PBS pH 7.4. Las proteínas retenidas en el gel-matriz fueron eluidas de la resina con buffer de Laemmli. Las proteínas eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE al 10% y teñidas con azul de Coomassie R-250. Para corroborar la unión de Pic a la hemina las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y analizadas por western-blot con anticuerpos específicos contra Pic (1:250). Para visualizar la reacción se siguió el procedimiento previamente descrito (Otto y cols, 1988)

IDENTIFICACIÓN DE UN POSIBLE RECEPTOR PARA EL COMPLEJO Pic-HEMINA.

Las cepas O42 y la clona P56 se crecieron en caldo Luria (LB) y caldo Luria tratado con 20 g/l de Chelex 100 (resina de intercambio iónico, Biorad) para eliminar el hierro del medio. La mezcla caldo resina se incubó por 2 h a 4 °C en agitación. La resina se eliminó por filtración, utilizando un embudo buchner con doble papel filtro (Wathman No. 1). El medio se distribuyó en matraces de 500 ml, colocándole la

mitad del volumen y en tubos de ensayo con 3 ml. cada uno. Todo el material utilizado se lavo con detergente neutro y se seco a 121 °C por 1 hora

Las cepas (O42 y P56) fueron inoculados en 3 ml de LB y LB tratado por 4 h a 37 °C en agitación (120 r.p.m.) De estos últimos se tomaron 250 µl de cada uno y se inocularon en un matraz con 250 ml del medio de cultivo correspondiente. Se incubaron durante 18 h a 37 °C en agitación (120 r.p.m.). Ambos cultivos se centrifugaron a 8000 g, 30 min. a 4 °C, el paquete bacteriano se resuspendio en 2 ml de Hepes 10 mM pH 7.4 y se rompieron las células por sonicación, con 5 pulsos de 30 segundos a 50 watts y 20% salida (Vibra cell). La suspensión se centrifugó por ultracentrifugación 20,000 g 10 min. 4 °C (Sorvall RC MROEX). El botón de membranas citoplasmáticas se solubilizó en 800 µl de sarcosyl al 1% en Hepes, en agitación suave y a temperatura ambiente por 30 min ; nuevamente se centrifugó a 20,000 g. 30 min y el paquete se resuspendio en Hepes 200µl y se conservó a -80 °C (Osborn y cols, 1974) El perfil de proteínas se analizó en SDS-PAGE al 15% tiñéndolo con plata.

DETECCIÓN DEL POSIBLE RECEPTOR DE MEMBRANA.

Las proteínas de membrana externa de la bacteria separadas en SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana con las proteínas transferidas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS y posteriormente se incubaron con cada una de las siguientes muestras: complejo Pic-hemina, Pic sola y hemina sola. Las membranas con cada una de las muestras se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces (5 min c/u) con PBS-tween 0.5%. Para visualizar el posible receptor las membranas se incubaron con anticuerpo anti-Pic (1:250) y se reveló con anti-IgG de conejo (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md), marcada con peroxidasa (1:3000). Para evaluar los falsos positivos se utilizaron membranas que se incubaron únicamente con el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo. Para visualizar la reacción se utilizó quimioluminiscencia (Western blot Chemiluminescence Reagent Plus de NEN) como fue descrito anteriormente.

CAPITULO VII

RESULTADOS

CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE TOXINA.

La producción óptima de la toxina (Pic) se analizó empleando caldo Nutritivo y medio Luria. El análisis de rendimiento mostró que el caldo Luria sin tetraciclina era más efectivo para la expresión de la toxina. Un aspecto más que fue analizado, se relacionó con el origen del extracto de levadura con el que se preparó el caldo Luria. Para tal se probaron extractos de Levadura de los laboratorios BIOXON y Merk, en este ensayo se observó que el extracto de levadura BIOXON incrementaba los niveles de expresión de Pic (Cuadro 3)

PURIFICACIÓN

Los diferentes procedimientos de precipitación (sulfato de amonio y amortiguador de fosfato de potasio k_1/k_2 1.75M) favorecieron de manera importante el enriquecimiento de Pic, ya que muchas proteínas de bajo peso molecular se eliminaron (Fig 1). La cromatografía en Q-sepharose mostró un perfil con tres fracciones de elusión, el análisis electroforético (SDS-PAGE) de estos reveló que Pic eluía en la primeras fracciones (Fig 1 y 2). El tratamiento de las proteínas eluidas de la columna de Q-sepharose mediante el sistema de alta resolución (FPLC), permitió obtener una sola fracción proteica (Fig 1 y 3). Utilizando un ensayo de electroinmunotransferencia y anticuerpos anti Pic se comprobó que la fracción obtenida correspondía a Pic (Fig 3).

El rendimiento final en el proceso de purificación se calculó al determinar la concentración de proteínas totales obtenidas en cada uno de los pasos de purificación. Los resultados mostraron que en la primera etapa de purificación se recuperaron 62.1 mg de proteína total, los que en la última fase de purificación dieron 355 μ g de proteína pura, que, corresponde a un rendimiento del 0.6%.

ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA Pic.

La obtención de anticuerpos contra Pic se realizó utilizando fragmentos de poliacrilamida que contenían la proteína parcialmente purificada. Se requirieron 4 dosis administradas a intervalos de 7 días, para obtener un buen nivel de anticuerpos. El suero precipitado con sulfato de amonio permitió obtener la fracción de gamma globulina la cual al ser evaluada mostró capacidad para reaccionar con Pic hasta una dilución de 1.500.

CARACTERIZACIÓN

PUNTO ISOELECTRICO

El punto isoelectrico (PI) se determinó por isoelctroenfoque. Se obtuvieron dos puntos en el intervalo de pH 7.2 en el área correspondiente al peso molecular de Pic (Fig 4). Lo anterior se corroboró mediante inmunoelectrotransferencia utilizando anticuerpos anti Pic. En éste se encontró que los puntos observados en SDS-PAGE eran reconocidos por los anticuerpos. El que se hayan detectado dos

fracciones en el mismo punto plantea la posibilidad de que Pic presente isoformas (Fig 5)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

Se realizó la secuencia de aminoácidos de Pic para evaluar si la proteína purificada se obtuvo de la clona P56 correspondía a la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de bases del gen. El resultado mostró la secuencia **AIVRSDIAYQIYRDFAXN** de la porción aminoterminal que corresponde en el 100% a la citada en el Genbank con el número de acceso AF097644 (Henderson y cols, 1999) Con este dato consideramos que todos los estudios sobre Pic se realizaron con una fracción pura de la proteína.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

EFFECTO SOBRE MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE CARNERO.

Los resultados de actividad de Pic sobre las membranas de eritrocitos mostraron que la proteína degrada dos fracciones de alto peso molecular (240 y 220 kDa) las cuales corresponden a las cadenas α y β de espectrina, dicho efecto se observó con 10 μ g después de 12 h de incubación (Fig. 6A y B). Para determinar que se trataba de las cadenas α y β de la espectrina se realizó inmunotransferencia que se reveló con anticuerpos específicos contra espectrina. Los resultados mostraron que Pic degrada la espectrina produciendo un producto de degradación de 120 kDa. Para determinar la participación del motivo de serina proteasa en la degradación de la espectrina se utilizó PMSF (inhibidor de serina proteasas específico). Los resultados obtenidos confirmaron que el sitio activo de Pic que participa en la ruptura de la espectrina es el motivo de serina proteasa. El ensayo con anticuerpos anti Pic, mostró que estos no neutralizan el efecto de degradación sobre las membranas, lo que sugiere que estos no bloquean el sitio activo de la toxina.

EFFECTO SOBRE CÉLULAS EN CULTIVO

Los ensayos de adherencia muestran que algunas cepas EAEC desprenden las células, esto sugiere la participación de productos con actividad citotóxica. Para evaluar la participación de Pic en el efecto citotóxico descrito, diferentes concentraciones de la proteína se inocularon sobre monocapas de cultivos de células HeLa, HEp-2, CHO y Vero. Se observó desprendimiento celular a la concentración más alta (50 $\mu\text{g/ml}$) a las tres h de incubación y un efecto citopático (alargamiento celular) sobre las células Vero con una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ después de 24 h de incubación. Esta observación plantea que Pic no posee actividad citotóxica importante y que el efecto sobre los cultivos de células Vero podría estar relacionado con la alta concentración de toxina utilizada y el tiempo prolongado de incubación (Fig. 7 y 8).

ANÁLISIS DE HOMOLOGIA DE LA SECUENCIA ENTRE PIC Y OTRAS SERINA PROTEASAS.

El análisis de la secuencia de Pic comparado con el de otras proteínas asociadas con virulencia se realizó con el programa MegAlign (DNASTAR,

Madison, WS). Los resultados confirmaron la homología que presenta Pic con Pet, EspP, EspC, SepA y Tsh, proteínas de la familia SPATE (Henderson y cols, 1999). Sin embargo, nuestro análisis mostró que Pic además presenta homología con proteínas no incluidas en esta familia, al respecto se observó una identidad de 39.2% con Pet y del 50% con una proteína de alto peso molecular (110kDa) llamada hemoglobina proteasa (Hbp), secretada por la cepa de *E. coli* EB1 aislada de humano (Otto y cols, 1998). Esta proteína presenta un motivo de serina proteasa el cual se encuentra localizado en el mismo sitio descrito en Pic (Fig. 9).

ACTIVIDAD DE HEMOGLOBIN PROTEASA

La homología con Hbp nos sugirió que Pic podría tener la misma actividad de degradación. Con hemoglobina humana como sustrato se observó que Pic degrada la molécula después de 4 h de incubación. Lo anterior se determinó al analizar la placa radiográfica en la que se reveló el efecto y observar como disminuía la emisión de luz en el carril que contenía la hemoglobina tratada con Pic (Fig. 10), comparado con un control de hemoglobina bajo las mismas condiciones pero no tratadas con la toxina. El efecto se analizó además en un

gel teñido con nitrato de plata, en el que se observa como las cadenas α y β de la hemoglobina se separan (Fig. 11). Este efecto no fue observado en el control de Hb sin tratar. Se analizó además si el efecto era dosis dependiente, al respecto se observó que la degradación de la hemoglobina era más intensa a mayor concentración de la toxina (Fig. 11). También se consideró llevar a cabo un ensayo variando las concentraciones de hb (10, 20 y 30 μ g) manteniendo constante la concentración de Pic (10 μ g) (Fig. 12) e incubando a diferentes tiempos (1, 2, 4, 8, 12, 24 h). El resultado nuevamente mostró degradación de las cadenas de hb con mayor efecto a tiempos más prolongados de incubación (Fig. 13) Los datos en conjunto indican claramente que el efecto de Pic sobre la hb es tiempo y dosis dependiente (Fig. 11 y 13).

El ensayo de inactivación del motivo de serina proteasa con PMSF confirmó la participación de dicho motivo en el efecto degradante de Pic sobre hemoglobina (Fig. 14).

UNIÓN AL GRUPO HEMO.

La capacidad de unión de Pic al grupo hemo, fue analizado en un ensayo de *cromatografía de afinidad*. Al utilizar altas concentraciones de Pic se observó un efecto de saturación de la hemina lo que se determinó al analizar la inmunotransferencia (Fig. 15). Para conocer cual era la concentración óptima para evaluar la unión al grupo hemo se utilizaron diferentes concentraciones de Pic, observándose que la concentración óptima era de 30 μg por cada 100 μl de agarosa-hemina

RECEPTOR PARA EL COMPLEJO Pic HEMINA.

Se utilizaron dos condiciones de cultivo de la bacteria, para la detección del posible receptor del complejo Pic-hemina. El análisis del perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de las cepas O42 y P56 no mostró diferencias entre los cultivos en medio completo o depletado de fierro (Fig 16). Se identificó en ambas bacterias (O42 y P56) una proteína de membrana externa de aproximadamente 20 kDa a la cual se une el complejo Pic-hemina (Fig. 17) El

ensayo también mostró que la unión era específica ya que los controles utilizados (Pic sola y anticuerpos) no se unieron a dicha fracción proteica

CAPITULO VIII

DISCUSIÓN

EAEC es uno de los grupos patógenos de *E coli* cuya importancia clínica y epidemiológica esta ampliamente demostrada. Estas bacterias se han relacionado con cuadros de diarrea persistente con o sin sangre en países en vías de desarrollo como la India, Brasil y México (Bhan y cols, 1989, Wanke y cols, 1991, Cravioto y cols, 1991). Los diferentes estudios muestran que las cepas EAEC elaboran diferentes toxinas, proponiéndose que estas son factores de virulencia asociados con la patogénesis de la diarrea (Nataro y cols, 1998b). La toxina llamada EAST1 (Enteroaggregative stable toxin 1) fue la que primero se describió en este grupo de bacterias (Savarino y cols, 1993), un segundo factor tóxico identificado en EAEC fue reportado por Baldwin y cols (1992), este producto presenta homología con la región rtx de la hemolisina de *E coli*. No obstante que ambas toxinas han sido identificadas en diferentes cepas de EAEC, hasta el

momento no se ha demostrado su participación en la inducción de diarrea en humanos. En estudios realizados en nuestro laboratorio se encontró que diferentes cepas de EAEC elaboraban dos toxinas de alto peso molecular, de estas se identificaron los genes que las codifican y se estableció su relación con diferentes cuadros de diarrea. Una de ellas (Pet) es una proteína de 104 kDa que se ha identificado principalmente en cepas de EAEC aisladas de niños con cuadros de diarrea aguda y persistente. La otra toxina que se ha llamado Pic, tiene un peso molecular de 114 kDa y se ha identificado preferente en cepas aisladas de niños que presentan diarrea con sangre (Hernández y cols, 2001). El análisis de las secuencias de aminoácidos de ambas toxinas, mostró que presentan homología con el grupo de serina proteasas llamada SPATE, grupo que se ha identificado en bacterias causantes de enfermedad en humanos. Los genes que codifican para Pic son cromosomales y se han identificado tanto en cepas de EAEC como en *Shigella flexneri* 2a. En estudios previos con Pic se encontró que esta proteína posee propiedad hemaglutinante sobre eritrocitos de diferentes especies, capacidad para degradar la mucina, así como de romper el complemento. Se ha considerado que estas propiedades de Pic son factores importantes que contribuyen a la colonización de EAEC (Henderson y cols, 1999).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que además de las características antes referidas Pic participa en la captación y transporte de Fe^{++}

propiedad que también esta relacionada con la actividad de colonización que se ha asignado a Pic

Para establecer de manera contundente las propiedades biológicas de Pic era necesario trabajar con la proteína pura. El empleo de precipitaciones con sales, cromatografía líquida convencional y de alta presión permitió obtener un compuesto con las características requeridas para un producto único (Fig. 1).

Aunque la metodología utilizada para la purificación fue satisfactoria, el rendimiento fue bajo. Lo anterior probablemente se relaciona con un proceso de autodegradación de la proteína ya que el producto es una proteasa y aunque se trabajo con condiciones para disminuir los efectos de degradación, el tiempo requerido para la purificación fue prolongado.

El análisis de la secuencia de aminoácidos del producto obtenido de la clona P56, mostró que esta correspondía a la reportada en el Genbank (AF097644), para Pic. Así mismo el estudio de inmunogenidad y especificidad con anticuerpos de conejo preparados contra la toxina, fue altamente satisfactorio, lo que confirmó también que el producto obtenido era Pic la serina proteasa identificada en las cepas EAEC.

El punto isoeléctrico que se determinó mediante isoelectroenfoque mostró que la toxina purificada presentaba una unidad mayor con respecto al dato que se predijo por la secuencia de aminoácidos (Henderson y cols, 1999). Lo anterior podría deberse a que nosotros trabajamos con la proteína secretada y el valor estimado por Henderson es el de la proteína completa (146 kDa). El análisis por isoelectroenfoque mostró dos fracciones con pesos moleculares similares (114 kDa) con una ligera variación en el P.I (Fig. 4 Y 5), que fueron reconocidas por los anticuerpos policlonales específicos contra Pic (Fig. 5). El resultado nos permite suponer que la proteína presenta cambios postraduccionales (Bruce y cols, 1994), este hecho requiere ser corroborado, para evaluar su contribución en la actividad de la enzima.

Aunque Pic y Pet, presentan alta homología, la actividad biológica de ambas es diferente. Lo anterior se corroboró al analizar si Pic era capaz de degradar la espectrina tal y como ha sido descrito para Pet (Villaseca y cols, 2000). El ensayo de degradación de espectrina realizado con Pic mostró una actividad menor que la inducida por Pet, observándose efecto solo a tiempos prolongados (Fig. 6). Lo anterior sugiere que la espectrina no es el sustrato específico de Pic y que la degradación observada podría estar relacionada más bien con la propiedad de proteasa que tiene la proteína.

La naturaleza de la diarrea y el daño intestinal observado en biopsias de intestino infectado naturalmente con EAEC (Knutton y cols, 1992; Hick y cols, 1996) muestran un efecto citopático sobre los enterocitos, que sugiere la participación de una o varias citotoxinas. En ensayos previos en asa ligada de rata en los que se inocularon Pet y Pic, se observó acumulación de moco y daño a las vellosidades intestinales que sugería actividad citotóxica de estos productos (Eslava y cols, 1993). En este trabajo al evaluar la actividad citotóxica de Pic sobre diferentes líneas celulares, se encontró que la proteína sólo causa efecto citopático sobre células Vero a concentraciones altas y después de un período largo de incubación. Estos resultados coinciden con reportes previos, en los que se refiere que fragmentos de intestino colocados en cámaras de Using desafiados con Pic no presentan alteraciones en los registros eléctricos, lo que confirma que la proteína no produce daño celular (Navarro-García y cols, 1998). Con respecto al daño que pudiera ocasionar Pic sobre el epitelio intestinal, sólo se ha establecido su participación en la colonización a través de su actividad de mucinasa (Henderson y cols, 1999)

Henderson y cols. (1999, 2001), refieren que Pic presenta homología con miembros de la familia SPATEs, entre los que se incluye Tsh hemoglobina-hemaglutinina de cepas patógenas de *E. coli* aisladas de aves. Tsh a su vez presenta homología con Hbp hemoglobina proteasa identificada en la cepa EB1

de *E coli*, presentando diferencias solo en los aminoácidos Q209K y A842T (Otto y cols, 1998)

EB1 y otras cepas patógenas de *Escherichia coli* son capaces de usar hemoglobina como fuente de hierro, componente importante para el metabolismo de las bacterias. Este metal puede ser adquirido a través de proteínas como los Sideróforos que compiten por el hierro libre, o por medio de enzimas que se unen al grupo hemo (Otto y cols, 1998). En este trabajo encontramos que Pic además de presentar identidad en la secuencia de aminoácidos con Hbp (50%), tiene una actividad semejante a la de esta última toxina. Los resultados obtenidos mostraron que Pic además de romper la hemoglobina tiene la propiedad de unirse al grupo hemo (Fig. 15). La habilidad de usar hemo como fuente de hierro, se considera como un determinante importante de virulencia en *E coli* (Wandersman y cols, 2000.) Aunque no hemos observado que Pic tenga la propiedad de lisar eritrocitos consideramos que la proteína tiene acceso a la hemoglobina y al grupo hemo por la participación de una hemolisina o por el efecto que tiene Pet sobre el citoesqueleto (Villaseca y cols, 2000). Una vez que Pic rompe la Hb y tiene acceso al grupo hemo se une y forma un complejo. Este último requiere regresar a la bacteria para que el grupo hemo sea internalizado, y por esta propiedad EAEC pueda mantenerse colonizando el epitelio intestinal por más

tiempo. *Serratia marcescens* presenta un sistema parecido al que hemos propuesto para Pic. Esta bacteria expresa un peptido de 19 kDa nombrado HasA (Heme acquisition system), que es secretado por el sistema de transporte ABC el cual tiene la capacidad de unirse al grupo hemo y una vez formado el complejo HasA-hemo regresar a la bacteria, para finalmente unirse al receptor de membrana HasR (Wandersman y cols, 2000) En *Escherichia coli* O157:H7 se han reportado la expresión de una proteína de membrana externa de 70 kDa cuando la bacteria se encuentra en condiciones de inanición de Hierro. Esta proteína que es similar a Shu (Shigella heme uptake) de *Shigella dysenteriae*, fija al grupo hemo por lo que se ha sugiriendo que estas proteínas son receptor en ambas bacterias (Mills y cols, 1995). Reportes previos señalan que dichos receptores dependen del complejo de traducción de energía TonB, ExbB y ExbD los cuales son muy conservados en la familia Enterobacteriaceae (Larsen y cols, 1996)

Nuestras observaciones sugieren que Pic utiliza un mecanismo parecido al descrito para *Serratia*. Lo anterior se apoya en el tamaño de la proteína (20 kDa), a la cual se une el complejo Pic-hemina, situación que no se presenta con la hemina ni Pic solas. Sin embargo, es importante señalar que estos resultados son preliminares y es necesario realizar nuevos ensayos con otros

controles para poder confirmar los hallazgos. En caso de tener resultados el paso siguiente será determinar la secuencia de la proteína para corroborar su función específica.

Así mismo, es importante considerar que existe una gran diversidad de sistemas propuestos para la captación de hierro en *E. coli*. Tal es el caso de ChuA de *E. coli* O157:H7 para el complejo Hb-hemina, FhuA o receptor de ferricromato-hierro y FepA receptor de enterobactina férrica (Moeck y cols, 2001; Clarke y cols, 2001), lo que también plantea la necesidad de mayor información al respecto para llegar a una conclusión definitiva.

Sin embargo, es importante mencionar para concluir que la participación de Pic en la captación y transporte de Fe^{++} , pudiera estar relacionada con la mayor incidencia en la expresión de la proteína en cepas aisladas de niños con cuadros de diarrea con sangre (Hernandez y cols, 2000)

CAPITULO IX

REFERENCIAS

Ausbel, F.M., R. Brent, R.E. Kington, D.D. More, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. Analysis of proteins. In: Ausbel , F.M., et al (de) Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates and Wiley-Intersciencie, New York, Chap 10, p. 10.0 1-10.12.9.

Baldwin, T.J., S. Knutton, L. Seller, H.A.M. Hernandez, A. Aitken, and P.H. Williams. 1992. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a haet-labil toxin antigenically related to *E coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **61**:2092-95.

Bhan M.K., M.M.Levine, J.B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S.Sazawal. 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* , **159**:1061-4

Bhatnagar, S., M. K. Bhan, H. Sommerfelt, S. Sazawal, and S. Saini. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea. *Scand. J. infect. Dis.*, **25** 579-83

Bizzini, B. Turpin, and M. Raynaud. 1969. Production et purification de la toxine tétanique. Annales l'Intitut Pasteur **116**:686-712

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem **72**: 248-50.

Brenner, D. J. 1978. Characterization and clinical identification of *Enterobacteraceae* by DNA hybridization. Prog Clin Pathol ; **7**:71-117

Brown, A. 1997. Visualization of single neurofilaments by immunofluorescence microscopy of splayed axonal cytoskeleton. Cell Motility and Cytoskeleton. **38** 133-145.

Bruce Alber, Dennis B., Julian L., Raff M., Jeith R., James D.W.. 1994. Cap. 3. Pag. 111137. En: Molecular Biology the Cell. Third edition. Published by Gaeland Publishing, Inc. 717 Fith Avenue, New York, NY 10022.

Chan K.N., Philips A.D., Knutton S., Smith H.R. Walter, Sith J.A 1994. Enteroaggregative *Escherichia coli* another cause of acute and chronic diarrhoea in England. J. Pediatr Gastroenterol Nutr **18**: 87-91.

Clarke T.E., Tari L.W., Vogel H.J. 2001. Structural biology of bacterial iron uptake systems. Current Top Med. Chem. **1** 7-30.

Cobeljic M, Miljkovic-Selimovic B, Paonovic-Todosijevic D., Velickovic Z., Lepsanovic Z., Zec N. et al. 1996 Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhea in a neonatal nursery ward. Epidemiol Infect. , Epidemiol Infect.,117:11-6

Cravioto, A., R. E. Reyes y R. Ortega. 1987 Incidencia y etiología de la diarrea aguda durante los dos primeros años de vida de una cohorte de niños rurales Bol Med. Hosp. Inf. Mex 44, 6 316

Cravioto A., Tello A., Navarro A., Ruiz J., Villafan H., Uribe F., and Eslava C. 1991. Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet. **337**:262-64.

Crosa, J.H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria Microbiol. Rev. **53** 517-30

Czeczulin, J.R., S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M. Kothary, F. Navarro-Garcia, and J.P. Nataro. 1997. Aggregative adherence fimbria II a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun **65**:4135-45

Dirección General de Epidemiología. 1980-1992 Boletín semanal de epidemiología SSA. México

Eslava, C., J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, and A. Cravioto 1993 Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, B-105. p.44. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology. Washington D.C

Eslava C., F. Navarro-García, J.R. Czeuczulin, I.R. Henderson., A. Cravioto, and J.P. Nataro. 1998 Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli* Infect Immun 66 3155-63

Fang, G.D., A.A. M. Lima, C.V. Martins, J.P. Nataro, and R. L. Guerrant. 1995. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case control study J. Pediatr Gastroenterol. Nutr. 21:137-144.

Farmer, J.J., B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. Wathen-Grady, C. Elias, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, C. O'Hara, G. K. Morris, P. B. Smith, and D. J. Brenner. 1985 Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteraceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 21 46-76

Green, A.A., and W.L. Hughes. 1955 Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salt and organic solvents. *Methods in Enzymology* Colowick S P and N O Kaplan (de.) Vol 1 Academic Press, New York, p. 67-87

Hanahan, D.J., and J. E. Ekholm 1974 The preparations of red cell ghost (membranes) *Biomembranes Part A (Methods in Enzymology, Vol. 31)*. New York. Academic Press

Henderson, I.R., F. Navarro-Garcia, and J.P. Nataro. 1998 The great escape: structure and function of the autotransporter proteins *Trends Microbiol* 6:370-78.

Henderson I.A., Czezuln. J., Eslava C.A., Noriega. F., Nataro. J.P., 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun* 67:5587-96

Henderson I.R., and Nataro J.P. 2001. Virulence functions of autoporter proteins. *Infect. Immun* 69:1231-43

Henry, F.J., A.S. Udo, C.A. Wanke, and K.M. A. Aziz. 1996. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. *Act. Pediatr. Suppl.* 381:27-31.

Hernández U., Villaseca J.M., Navarro A., Cravioto A., Eslava C. 2001. Expression of Pet and Pic the Serine Protease from Enteroaggregative *Escherichia coli*, in strains isolated from Mexican children with and without diarrhea. In abstracts of 101 General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology Orlando FL. B-226 Pag. 92

Hicks, S., D.C.A. Candy, and A.D. Phillips. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect. Immun* 64:4751-60.

Huppertz H, Rutkowski S, Aleksic S, Katch H. 1997. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *Lancet*, 349:1660-2

Itoh Y., Nagano Y., Kunishima M., Ezaki T., 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J. Clin. Microbiol* 35:2546-50

Knutton, S., Shaw, R.K., Bhan, M.K., Smith H.R., Mc Connell, M.M., Cheasty, T., Williams, P.H. and T.J. 1992 Ability of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucose Infect Immun **60**:2083-91

Knutton S., Shaw R., Phillips A.D., Smith H.R., Willshaw G.A., Watson P., Price E 2001. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom J. Pediatr Gastroenterol Nutr **33**:32-41.

Krieg, N. R. and J. G. Holt (eds). 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vo. 1, p.408-600. 1984 Williams & Wilkins, Baltimore.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature **22**:680-83.

Larsen Ray A., Myers Paul S., Skare Jonathan T., Seachord Carrie L. Darveau Richard P., and Postle Kathleen. 1996. Identification of TonB homologs in family Enterobacteriaceae and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. Journal of Bacteriology **178**:1363-73.

Létouffé S. Ghigo J.M. and Wandersman C. 1994 Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. Proc Natl. Acad. Sci. USA **91**:9876-80.

Levin M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent J. Infect Dis. **155** 377-89.

Mietzner, T.A., and S.A. Morse. 1994. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Nutr.* **14**:471-93.

Mill Melody and Payne Shelley M. 1995 Genetics and regulation of heme-iron Transport in *Shigella dysenteride* and detection of an analogous sistem in *Escherichia coli* O157 H7. *J Bacteriology.* **177** 3004-3009.

Moeck G.S., Letellier L. 2001. Characterization of in vitro interaction between a truncated TonB protein from *Escherichia coli* and the outer membrane receptors FhuA and FepA. *J. Bacteriol* **183** 2755-64

Murray P. Deutscher. 1990 Ion-Exchange Chromatography. En: Guide to Protein Purification Copyright by Academic press, Inc. Section VII Pag. 309-317

Nataro, J.P., M.M. Baldini, J.B. Kaper, R.E. Black, N. Bravo, and M.M. Levine. 1985. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J. Infect Dis.* **152**:560-65.

Nataro, J.P., K.O. Maher, P. Mackie, and J.B. Kaper 1987. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infec. Immun* **55**:2370-77

Nataro J. P., Y. Deng, D.R. Maneval, A.L. German, W.C. Martin, and M.M. Levine. 1992 Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infec. Immun* **60** 2297-304

Nataro J.P., D. Yikang, S. Cookson, A. Cravioto, S.J. Savarino, L.D. Guers, M.M. Levine, and C.O. Tacket. 1995 Heterogenicity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers J. Inf. Dis 171 465-68

Nataro, J. P., S. Hicks, A. D. Phillips, P.A. Vial, and C. L. Sears. 1996 T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis Infect. Immun. 64 4761-68

Nataro, J.P., T. Steiner, and R. Guerrant. 1998a Enteroaggregative *Escherichia coli*. Emerg Infect. Dis. 4 251-61.

Nataro J. P., and Kaper J. B. 1998b. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microb Rev. 11 143-201

Navarro-Garcia, F., C. Eslava., J.M. Villaseca., R. Lopez-Revilla, J.R. Czeuczulin., S. Srinivas, J.P. Nataro., A. Cravioto. 1998 In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli* Infect. Immun 66:3149-54

Navarro-Garcia F., C. Sears, C. Eslava., A. Cravioto, and J.P. Nataro. 1999 Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 67 2184-91

O'Farriell, P.H High Resolution Two-Dimensiones electrophoresis of proteins, 1975, J. Biol Chem 250 4007-4021

Osborn, M.J., and R. Munson. 1974. Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram-negative bacteria. Methods Enzymol 31A 642-53

Otto B.B., Dooren S.J.M., Nuijens J.H., Luirink J., and Oudega B. 1988 Characterization of hemoglobi protease secreted by pathogenic *Escherichia coli* strains EB1 J Exp. Med 188 1091-1103

Pai M., Kang G., Ramakrishna BS., Venkataraman A. Muliyl J. 1997 An epidemic of dairhoea in south Indian J Med. Res. 106:7-12.

Provence D.L., Curtiss III R., 1994 Isolation and Characterization of a Gene Involved in Hemagglutination by an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain.,

Savarino,S.J.,A.Fascano,D.C. Robertson, and.M.M. Levine. 1991 Enetroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demostrable in an *in vitro* rabbit intestinal model.J. Clin Invest. 87:1450-55

Savarino S. J., A. Fascano J. Watson, B.M. Martin, M.M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993 Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E coli* heat-stable toxin. Proc Natl. Acad Sci. USA 90 3093-97

Savarino, S.J., A. McVeigh, J. Watson, J. Molina, A. Cravioto, P. Echeverria, M.K. Bhan, M.M. Levine, and A. Fascano. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. J Infect Dis 173:1019-22.

Scalestky ICA, Silvia MLM, Trabulsi LR. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HELA Cell. Infect Immun. 45:534-36

Sepulveda, J. 1990 Malnutrition and infectious diseases A longitudinal study of interaction and risk factor Perspectivas en salud Pública No 9 Inst. Nacional de Salud Pública, México

Smith H. R., S.M. Scotland, G.A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava 1994 Isolated of *Escherichia coli* O44 H18 of diverse origin are enteroaggrgative J Infect. Dis. **170**:1610-13

SSA. 1988. Encuesta sobre práctica y prevalencia de la terapia de rehidratación oral en 1987 (EPPTRO) SSA, México.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications Proc Natl. Acad Sci USA. **79**:4530-34.

Tzipori S., J. Montanaro, R.M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M.M. Levine. 1992 Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model Infect. Immun. **60**:5302-6

Vial, P.A., Robins Browne, H. Lior, V. Prado, J.B. Kaper, J.P. Nataro, D. Maneval, A. Essayed, and M.M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis **158**. 70-79

Vila J., Vargas M., Henderson I.R., Gascon J., and Nataro J.P: 2000. Enetroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in travelr's diarrhea strains. J. Infect Dis **182** 1780-3.

Villaseca. J.M., Navarro-Garcia. F., Mendoza-Hernandez G., Nataro. J.P., Cravioto A., Eslava C. 2000 Pet toxin from Enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. Infect. Imm. **68** 5920-27.

Wanke, C.A., S.Cronan, C. Goss, K. Chadee, and R.L. Guerrant. 1990. Characterization of binding of *Escherichia coli* strains which are enteropathogens to small-bowel mucin. Infect Immun **58**:794-800

Wandersman Cécile and Stojiljkovic Igor. 2000 Bacterial heme sources. the role heme, hemoprotein receptors and hemophores Current Opinion in Microbiology **3**:215-20

Wasteson Yngvild 1991. Application of Molecular Biological Methods in Diagnosis of Pathogenic *Escherichia coli* Dept Micr. Immun. Oslo. pag. 3

Weber, K., and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamida gel electrophoresis J Biol Chem. **244** 4406-12.

CUADRO 3
RENDIMIENTO DE Pic EN CALDO LURIA
BAJO DIFERENTES CONDICIONES

EXTRACTO DE LEVADURA	 mg/ml
Merck	0.745
Merck/Tetraciclina	1.35
Bioxon	1.63
Bioxon/Tetraciclina	0.781

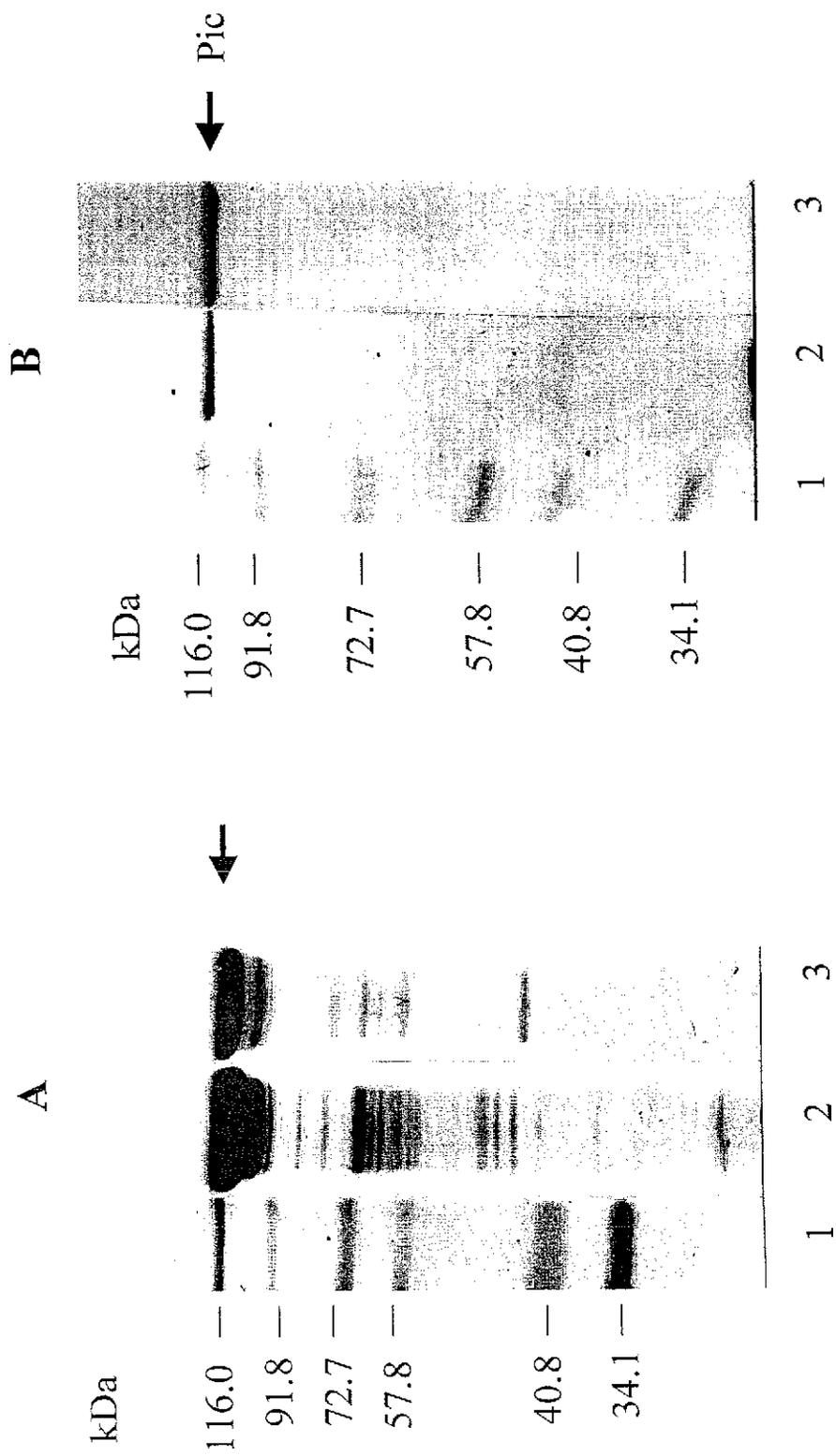
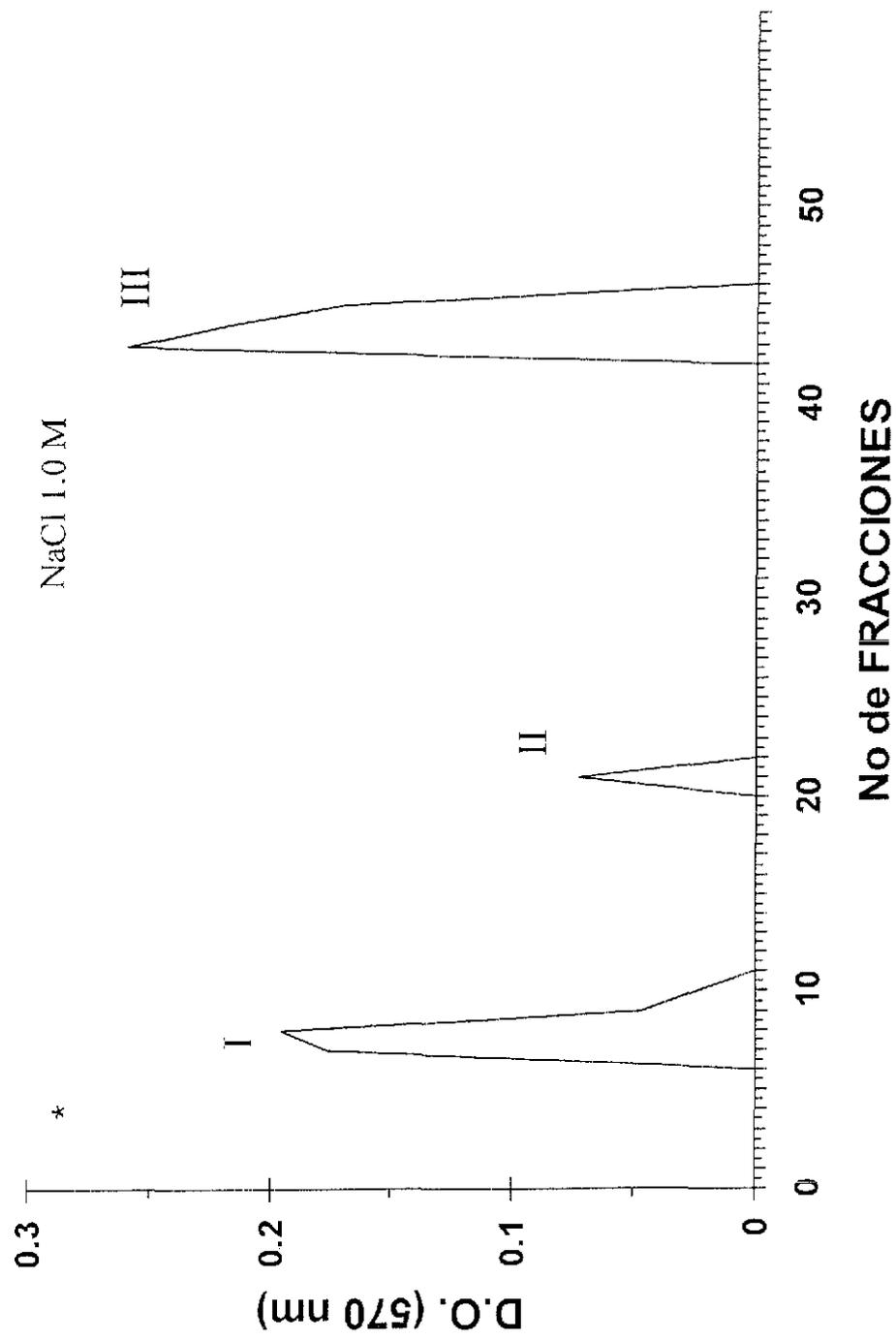


Fig 1. Proceso de purificación de Pic. SDS-PAGE al 10%. **A.** Precipitación con sales. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) precipitación con sulfato de amonio al 75%, 3) Precipitación con fosfato de potasio 1.15 M. **B.** Purificación por cromatografía. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Pico I de la cromatografía convencional en Q-Sepharose, 3) Pico II de la cromatografía en FPLC en una columna Mono S HR 5/5. Gel teñido con azul de Coomassie.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



* 0.05M Tris-HCl, 0.01M EDTA.2Na. pH 8.0

Fig. 2. Perfil de elución de la cromatografía por Q-sefarosa. La fracción I de la cromatografía corresponde a Pic.

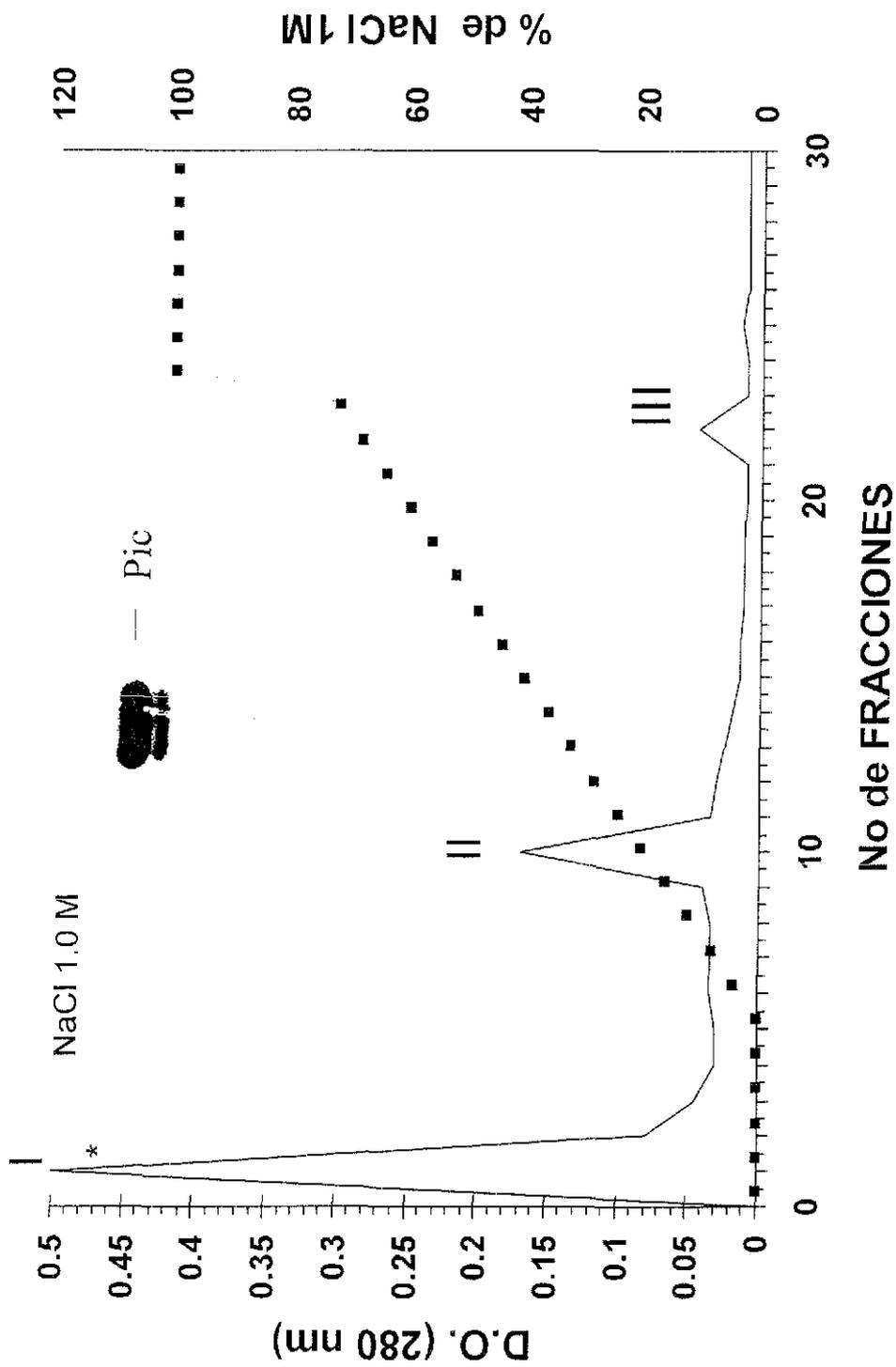


Fig. 3. Perfil de elución de la cromatografía por FPLC. En el pico II de la cromatografía se obtuvo Pic libre de contaminantes

74

4.0

7.2

7.5 pH



Fig. 4. Isoelectroenfoque SDS-PAGE 10%. Punto isoelectrico (7.2) de Pic. Tinción con azul de Coomasie.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A

kDa

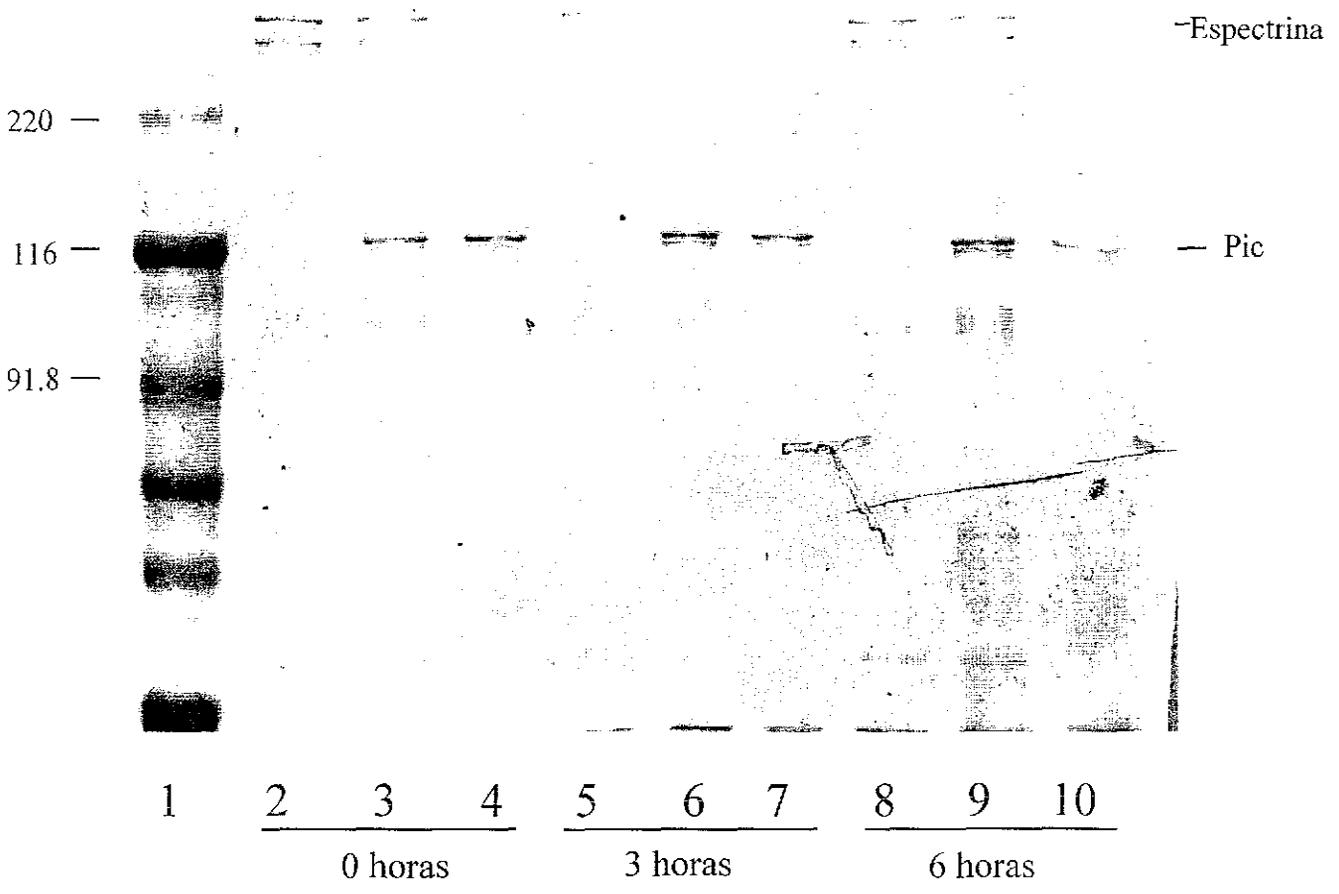


Fig. 6A. SDS-PAGE (6%). Ensayo de la actividad biológica de Pic sobre membranas de eritrocitos de carnero con tiempos de incubación a las 0, 3 y 6 horas. 1) Marcador de pesos moleculares; 2, 5 y 8) control de membranas de eritrocitos; 3, 6 y 9) Membranas de eritrocitos tratadas (10 ug) con Pic (5 ug). 4, 7 y 10) Pic. Gel teñido con azul de Coomasie.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

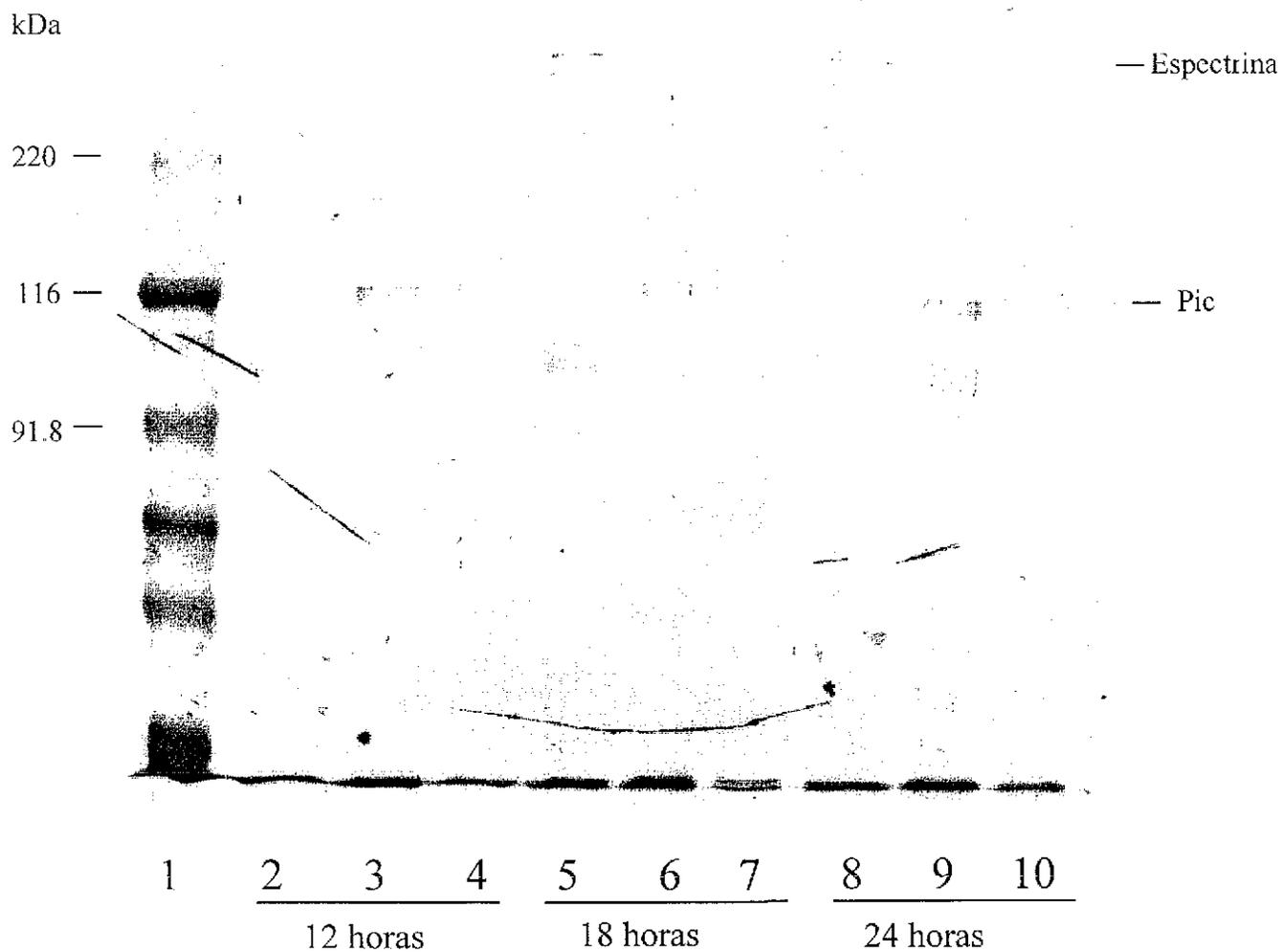
B

Fig. 6B. SDS-PAGE (6%). Ensayo de la actividad biológica de Pic sobre membranas de eritrocitos de carnero a diferentes tiempos de incubación. 1) Marcador de pesos moleculares; 2, 5 y 8) control de membranas de eritrocitos; 3, 6 y 9) Membranas de eritrocitos tratadas (10 µg) con Pic (5 µg). 4, 7 y 10) Pic. Gel teñido con azul de Coomasie.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

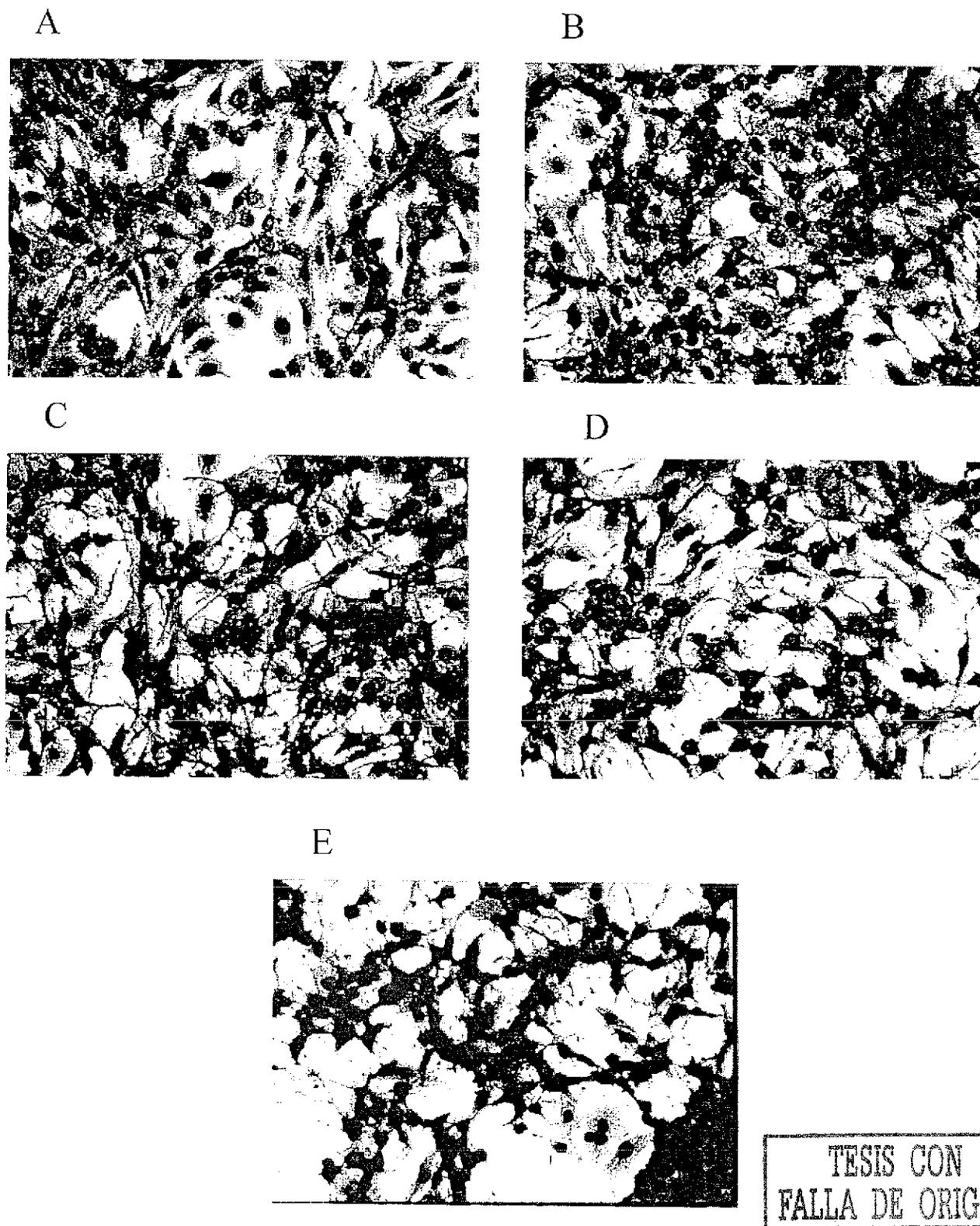


Figura 7.- Microscopía fotónica de monocapas de células Vero tratadas con diferentes concentraciones de Pic: A Control sin tratar; B 2.5 µg.; C 5.0 µg;; D 10 µg ; E 20 µg. Las células se incubaron 24 hrs en 5% de CO₂, tinción con Giemsa, amplificación 20X.

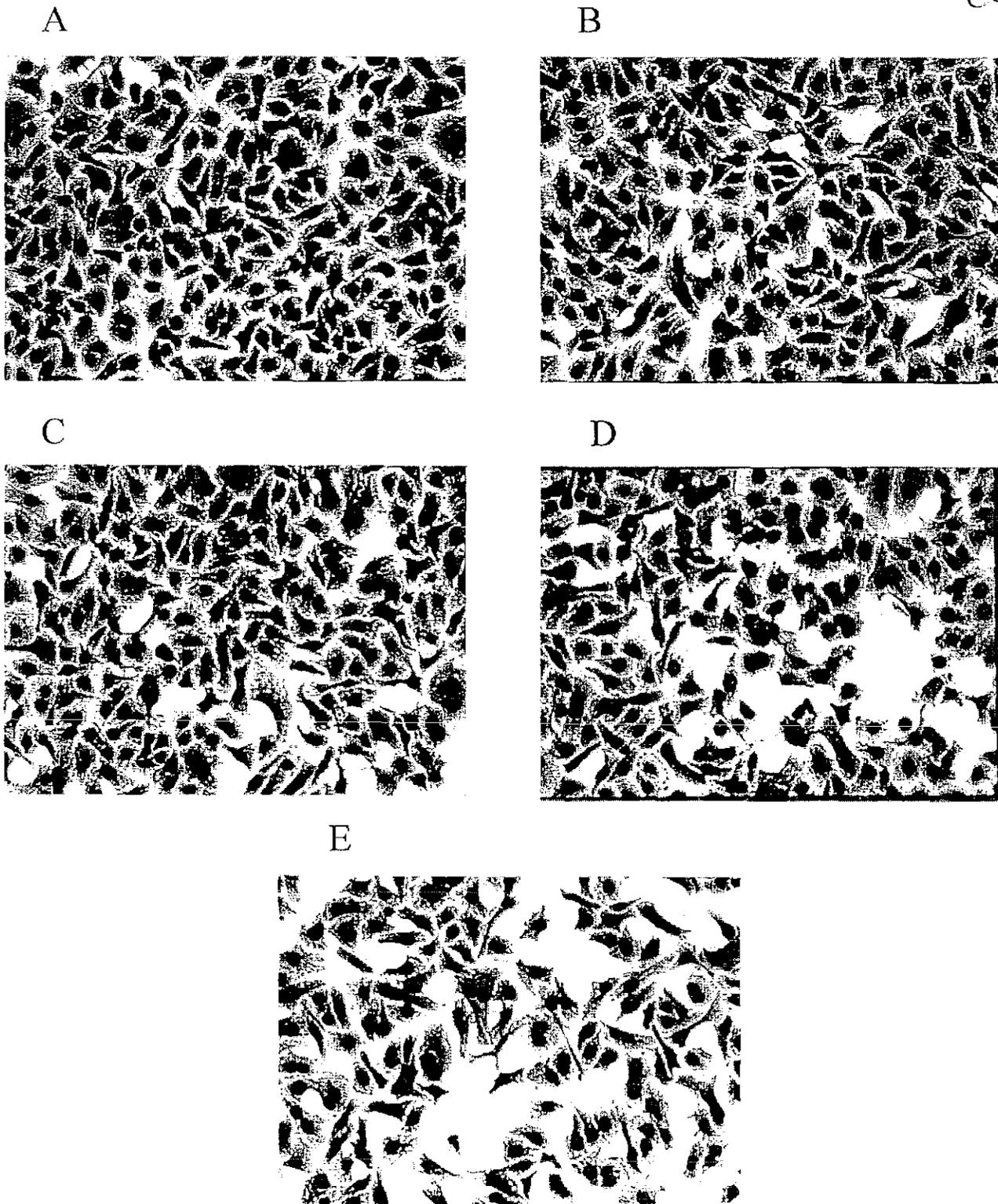


Figura 8 .- Microscopía fotónica de monocapas de células HEp-2 tratadas con diferentes concentraciones de Pic: A Control sin tratar; B 2.5 µg.; C 5.0 µg.; D 10 µg ; E 20 µg. Las células se incubaron 24 hrs en 5% de CO₂, tinción con Giemsa, amplificación 20X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

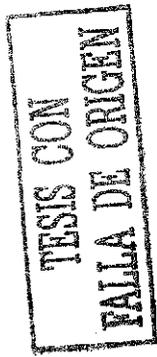
Figura 9 . Secuencia de aminoacidos de *Pic vs **Hbp

```

* MKRYSLKYPVPTGGGLIAVSELANRV LKTCRRRLCH::LAGIPALCLCYLS
** MKRIYSLRYSAVARGFTAVSEFARKCVKSVRRLLCFVLLIP--VJFS
* * * * *
QI SQAGIVASDIAYQIYRDEAENKGLFVPGANDIPVYDKGKIYGRLSKA
AGSLACTVNEELGYQLFRDEAENKGMFRPGAVNIAIYNKGEFVGTLDKA
* * * * *
PQADFSVSSSN -GVATLVSPOYIVSVRKHNGYRSVSEFGKNTYLSLVDRN
AMPDFSAVDEICVATLIINPOYIASVKHNGCYTAVSEFGDGENRYNIVDRN
* * * * *
NHPSLDFHAPR_LNKLYTEVIFSAVTSRCKANAYKYTERYAFYRVSGST
NAPSDFHAPRDKLVTEVAPTRAGAVAGAYLDKERYPVFVRLSGST
* * * * *
QYTKDKGGLVYKAGSYAFKTTGGTIG--VPLSDATIVSNFGQTYN-PVN
QYIKDNGQLTKYGGAYSWLTSCTVGSLSSEYQNGEXISTSGLVFDYRLN
* * * * *
GELHLYCAPQDSSPLEAYDKQKWKVIVAVLRAVACINGATNKNVYIPT
GAMP-VGEAGDSSPLFAEPTVQNKWLVGVLTAGNGAGGRGNKAVLFL
* * * * *
DYLNQYVQDDFDFVDFVSGIG-PLNWTYDKTSGFTLSGSKNKTMRGQ
DFTGKENEEDNDALVYFRTEGGALEWSEYSSSTGAGALTQGTITYAMRGG
* * * * *
KNCNLNAGENLIVFSGQNGAII_LKDSVTOGAYLEFKDSYPVSAESGXTWT
QGNCLNAGKRLIFQGNKQ_NLKDVSQAGAGLTPRKNYVYVTSNGSTWT
* * * * *
GAGCTTDKGTIVYKYNVNGVAGDNLHKLGGELTINGTGVNFGGLKTDGDI
GAGIVYDNEVSYKQWYNGVKGDNLHKIGEGTLTYQGCENEGGLKRVGGK
* * * * *
VVLNQQKQAFAGNQAQSSVNIASGRPTVVLCAKQVNPDESWGVRGGK
VVLNQQKQDNKQVQAFSSVATASGRPTVVELDERQVNPQTVSWGVRGGK
* * * * *
LLMGNVATIRLGAALYGVITNAQKSGGIIIDLKAQDTNVSPTTGN
DYNGNSLTHQLKARYGAVLANVUKRATITIDYALRADKVALNKGSES
* * * * *
SPFGTGTFGNLYS--NFIINSQTSFYILKSAZYGNLWAGNSLINDFQWHEF
---GKTAGNLYKYNPYNTTDFYILKQSYIC--YEPTQOSSNATWEE
* * * * *
VGSNKNKAVQVTKDRILLAGRAKQVPIPHCOLTGNMVAIPOVYPPGGNK--V
VGSQGAQKLVADRENFI---AGYLFQGLKGNLNVDN-RLPEVGTGAL
* * * * *
IIDGSVNLPECTLSQCSQTLIFQGHPIVFASTG-----S
VMDGAAJISG-TFTQENGRLLTQGHPIVFAINIQSVACLKLAASGSHSVLT
* * * * *
APVSIHQDMEENRQFTKKTLSLKDADPHLSRNASLNKSIDKSNSHITLGS
QPTSFSEDENRSEFTFRLSLKNTDFGLGNATLNTIIOADNSVTLGD
* * * * *
DRAFVKNQDGTGNVYIPEEGTSVPDYVNDRSQYEGNIILNHNNSALDIGSR
SRVFDKNDGGQTAFTLEEGTSVATKDAKSVENGTVALDNGQSLVINDI
* * * * *
FTGCE_DAVDSAVSITSPDVLTLTARCAEAGSSTVHDGGHITALNGLFSQD
ENGSEQANNSVNISSDSAVLGNSTLSTALN_LNKGANALASQVFSDS
* * * * *
HIQAGKNGKITLSGTPYKDTANQAPAVYITDGYDLTGENAALEITRGAH
PVNLS-DATILSNRP-DEVSHLLPYVDYAGSNLKGDDARLNVQPYSM
* * * * *
ASGDIHABAASVTIGSDTPAELASAEIASAFAFAGSLLLEGYNAAFNCAIT
LSGNIWQDKQKOTVILGSE--GELSPDLTQ_NQMLYSLFNGYRNINWSSIN
* * * * *
GSRADVEMINALWFLGGDSAJHSLIVRNSRSESSEG-DRFRTLTVNKLDA
APDATVSEXTDTPQSMNGNSTAGNKLNRTEVGFNGGTSPTFTLITDNLDA
* * * * *
TGSDFVIRTDLKNADKLNVEKATGSDNSLNVSFNNPAQGOALNIPLYI
VQSAFVWRDNLNKADKLVINKSATGHDNSIWNVFLKPKSKDTLIPVLS
* * * * *
APAGTSAHEKAGTRVIGFSRVPTLIVDTSGNTKWLIDGFKADAKAA
APEATAONLFRASIRVWQFSQVPTILSVKEDCKEWFVDGQVARNQGO
* * * * *
AAKAUSFMNAGYKKEFYENKLNKRMGDLRDTNGDAGAWARIMSGAGSAD
SKAAATFMHISYNNKFTTEVNNLNKRMGDLRDTNGEAGTIVRLLNGCSAD
* * * * *
GGYSDNYTHVQVGFDRKKHELQGVDDLFTGVYTWYTDSSASHAFSGTKSV
GGFTDHYTLQMGADRKKHELQSHDLFTGVKATYTDTDADADLISGKTKSW
* * * * *
GGGLYASALFEGGAYTDLILCKYTHHDNDYTGNDASLGTKKHYTFSWYAGA
GGGFYASGLFRSGAYFDVIAKYTHNENKYDLNFAAGAKQNFRRSHSLYAGA
* * * * *
ETGYRYHLTDDTTEPQAEILVYGVASGKTFERKDGDMDSLMMKRRDQFSPLV
EYGYRYHLADTTTEPQAEILVWGRJQGTFFNMNDSGMNDYSMKRNSVNPV
* * * * *
GRFVVELGRTFSGKDWSTARACTSKQFDL_LNNGETVLRDASGEKRTKGE
GRFVYVSGKTFSGKDWSLPARAGEHIEFDLTSADVHLKDAAGEHQINGR
* * * * *
KDSRMFLVNGMNAQIKDNRFRGLETFEKSAFGKYVVDNAVNAETRYMF
KDSRMILYGLNARFGDNRFLGLEVERSAFGKYNTDDAINANIRYSF
* * * * *

```

* Motivo de serina proteasa



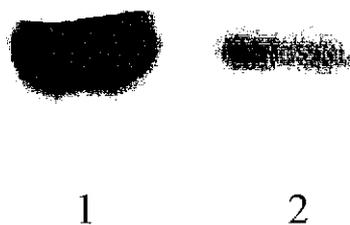


Fig. 10. SDS-PAGE visualizado por autoradiografía con reactivo para quimioluminiscencia. Actividad de hemoglobina proteasa inducida por Pic.. 1) Control hemoglobina humana; 2) Efecto de Pic sobre Hb humana (10/10ug), la mezcla se incubo 3 horas a 37°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

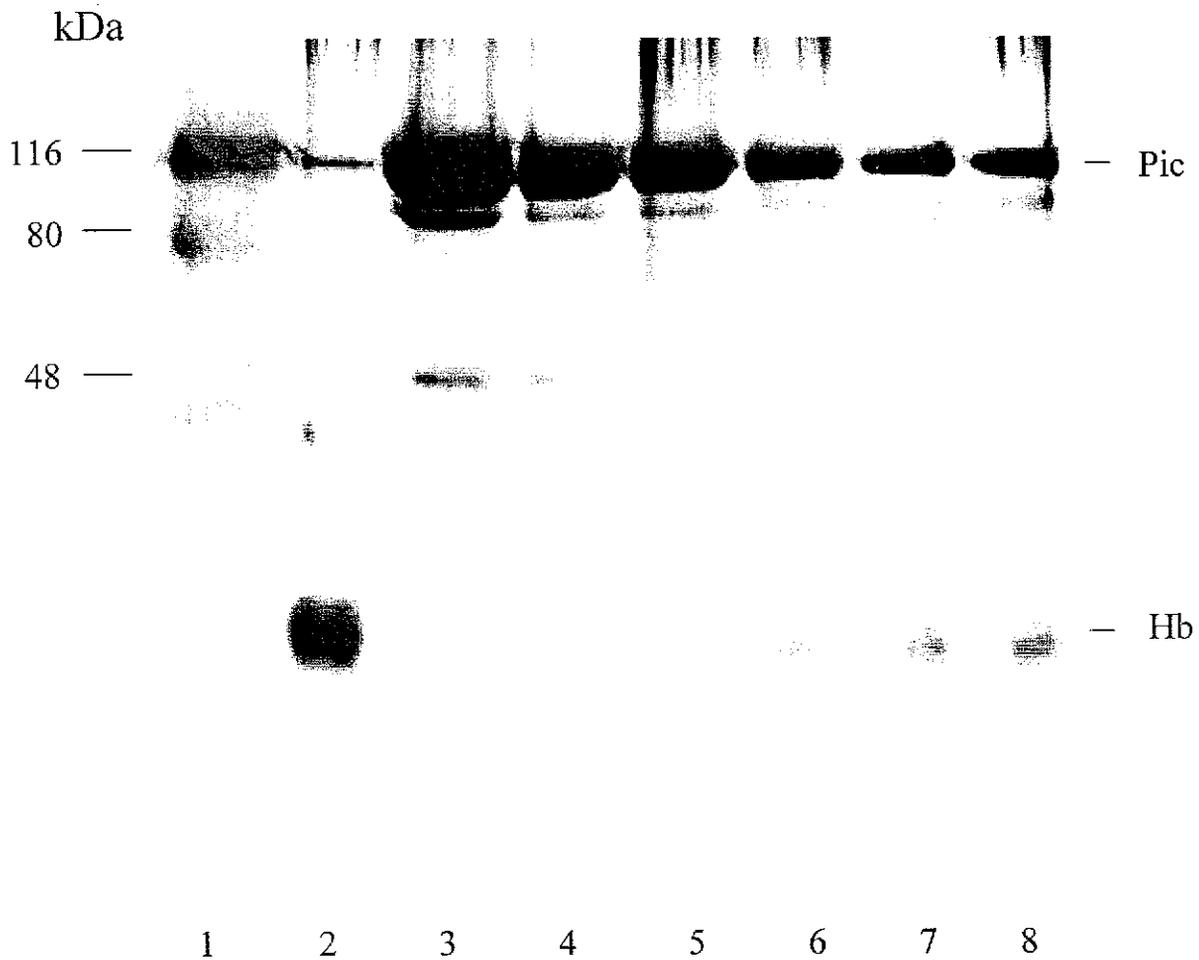


Fig.11 . SDS-PAGE (10%) tinción con plata. Efecto de diferentes concentraciones de Pic sobre Hb humana. 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Control de Hb (10 μ g); 3-8) Hb (10 μ g) incubada durante 3 horas con 40,20,10,5,2.5 y 1.25 μ g de Pic.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

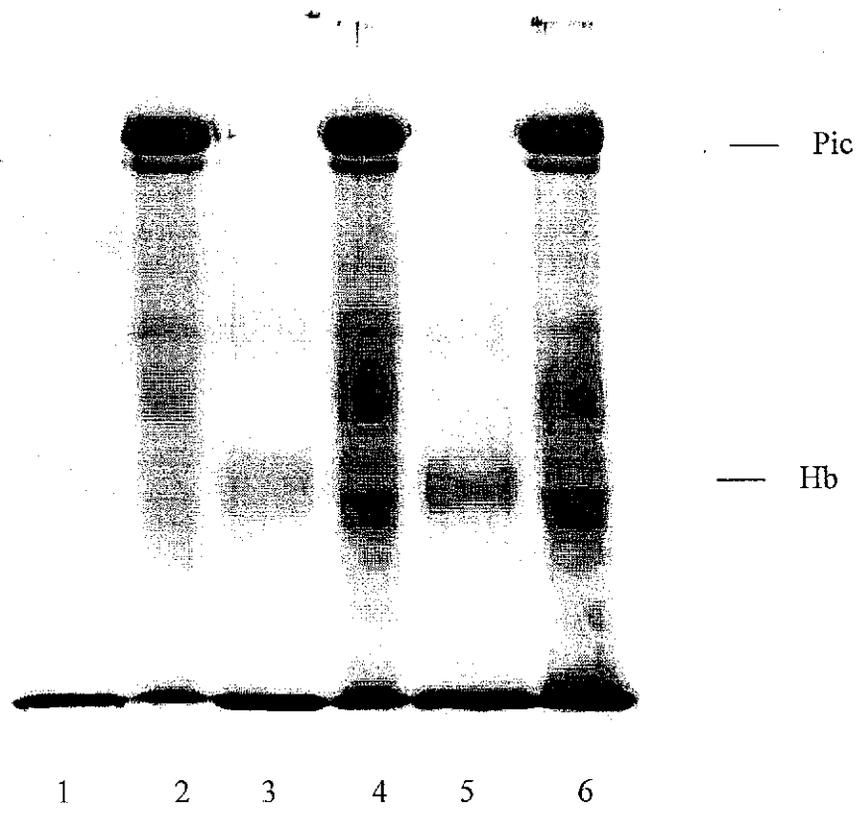


Fig.12. SDS-PAGE 10%, tinción de plata. Efecto de Pic con diferentes concentraciones de Hb. Carriles 1,3 y 5 hemoglobina (10,20 y 30 μ g) sin tratar. Carriles 2,4,6 Hb (10, 20, y 30 μ g) incubada con Pic (10 μ g).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

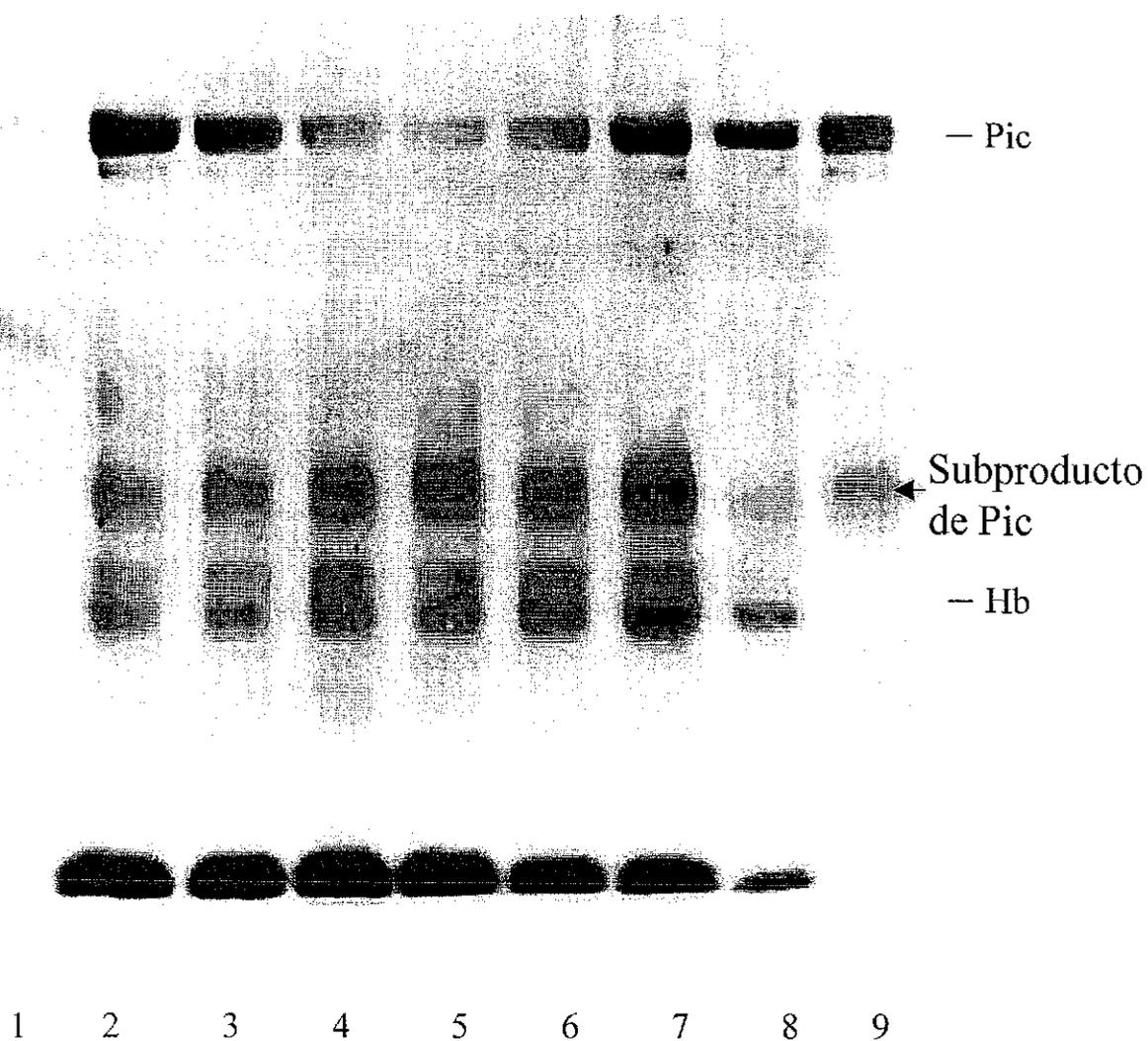


Fig. 13. Actividad de hemoglobina proteasa de Pic. SDS-PAGE (10%). Carril 1. Marcador de pesos moleculares. Carril 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 Pic/Hb (10/10 μg) a diferentes tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Carril 9. Control de Pic (10 μg)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

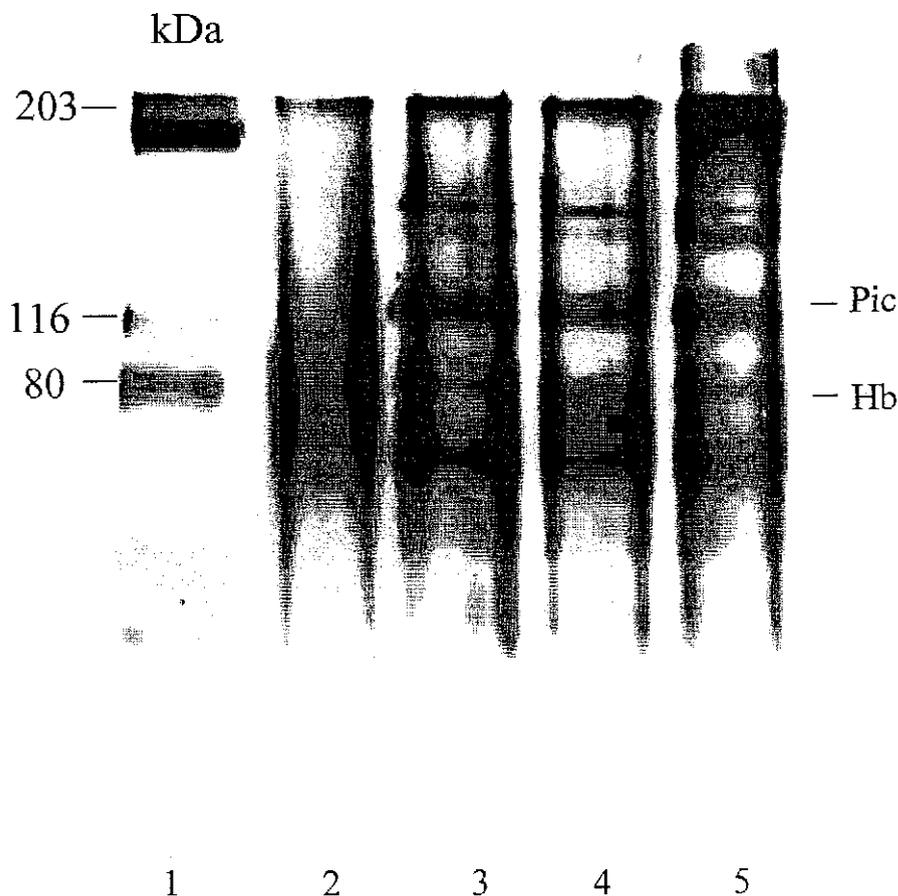
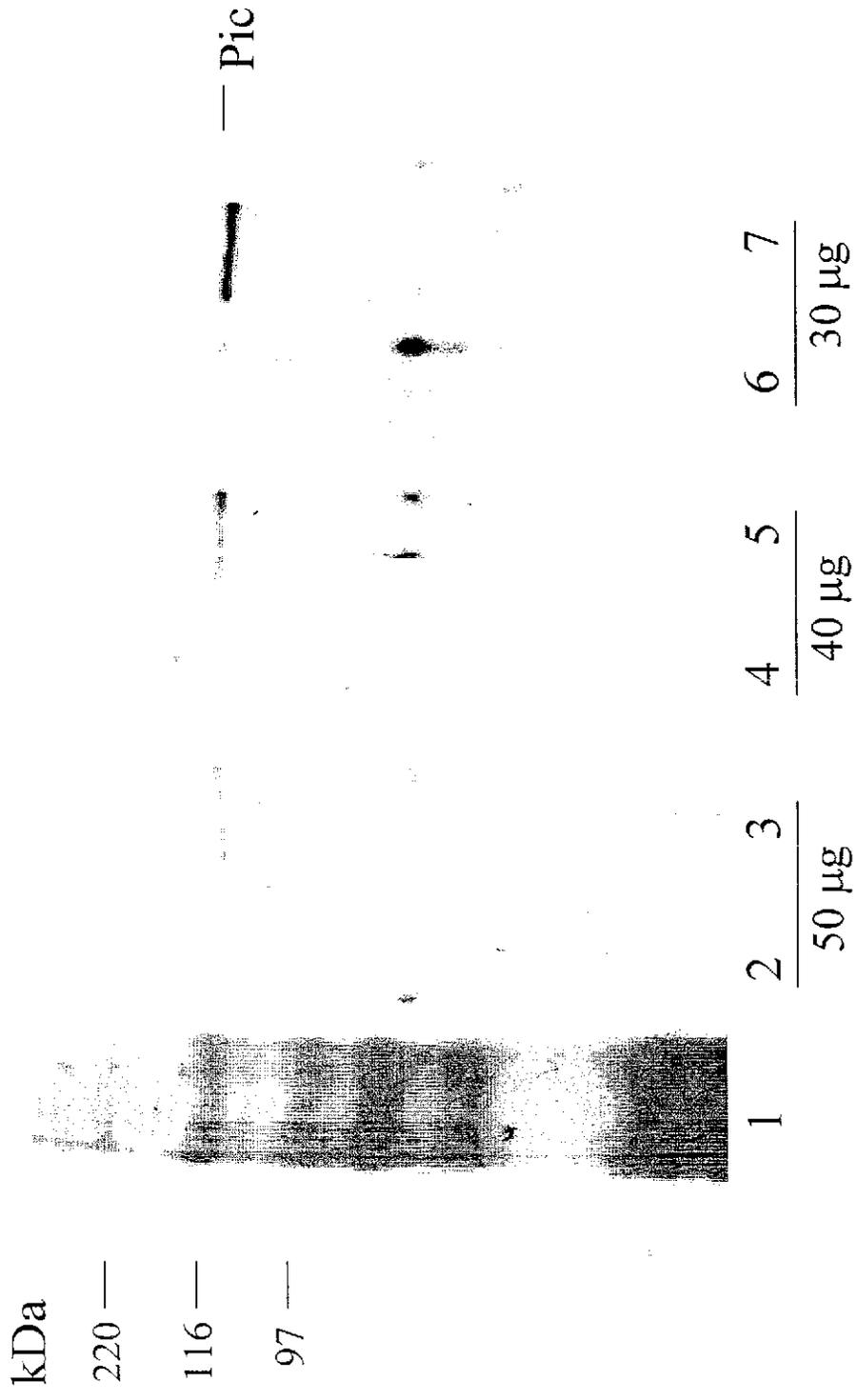


Fig. 14. PAGE (10%) tinción con plata. Ensayo de inhibición y neutralización de la actividad de homoglobina proteasa de Pic con PMSF y anticuerpos policlonales anti- Pic. 1) Marcador de pesos moleculares; 2) Control de Hb humana (10ug); 3) Actividad de hemoglobina proteasa de Pic (10ug/10ug); 4) Inhibición del efecto degradante con PMSF; 5) Neutralización con anticuerpos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figure 15 . Immunotransferencia de la union de Pic al grupo Hem. Diferentes concentraciones de Pic fueron incubadas con 100 µl de agarosa-hemina toda la noche a 4 °C. 1) Marcador de pesos moleculares, 2, 4 y 6, Pic no retenida en agarosa-hemina; 3, 5 and 7, Pic retenida en agarosa-hemina.

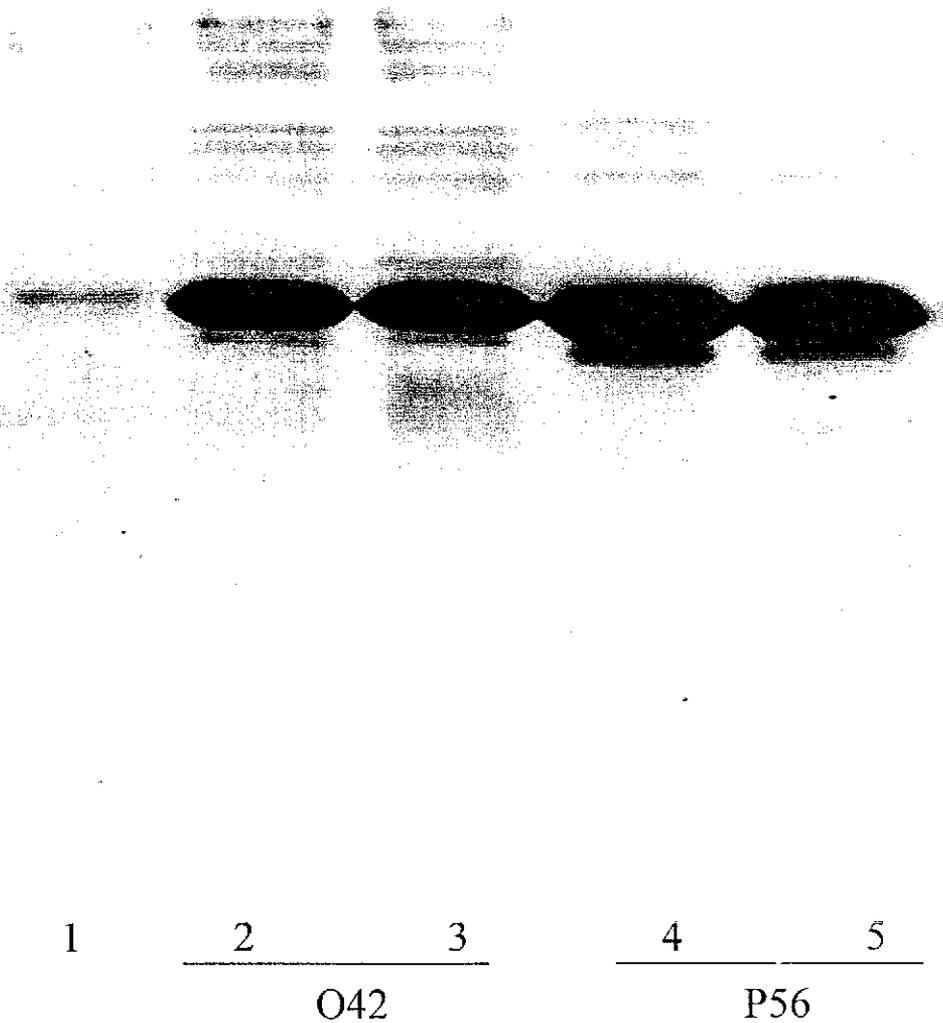


Fig 16. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de las cepas O42 y P56 cultivadas en caldo luria completo (2, 4) y depletado de Fe^{++} (3, 5). Carril 1, marcador de pesos moleculares. SDS-PAGE 15%, teñido con plata.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

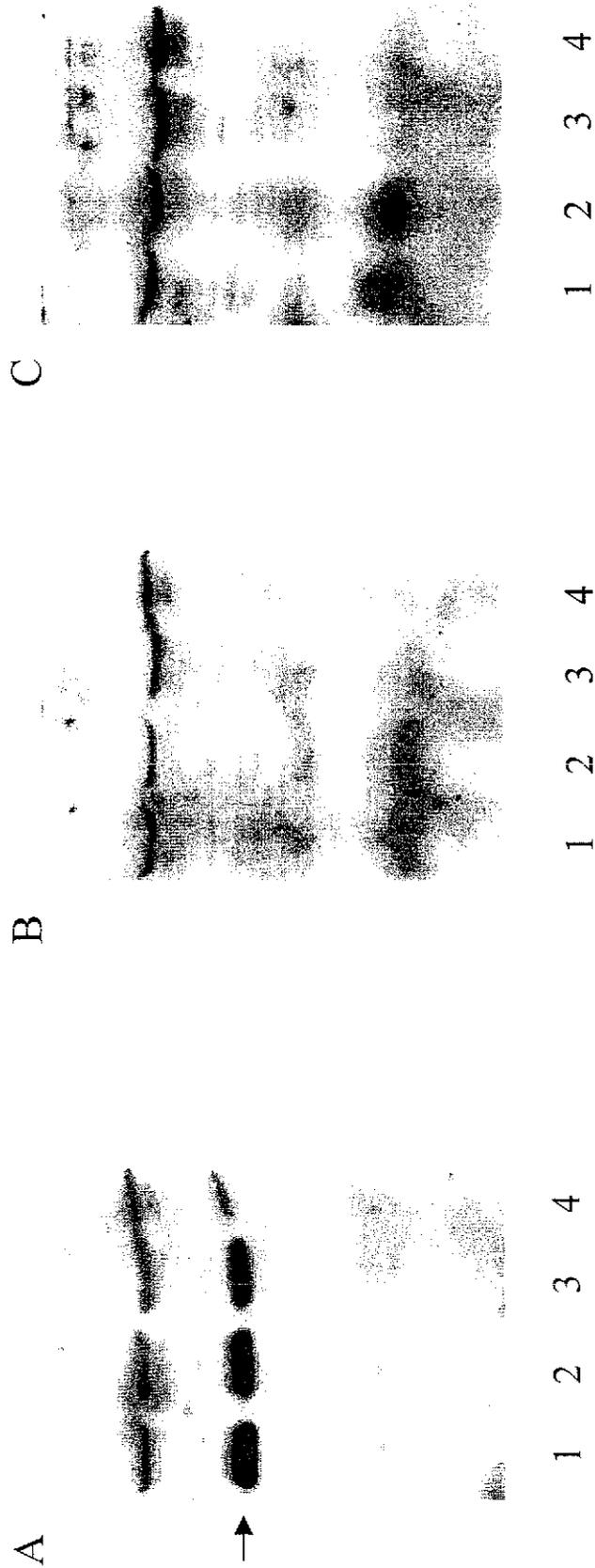


Fig17. Detección del receptor bacteriano del complejo Pic-hemina. Inmunotransferencia de las proteínas de membrana externa de las cepas O42 carriles 1 y 2 y P56 carriles 3 y 4. Los carriles 1 y 3 corresponden a los cultivos en caldo luria, carriles 2 y 4 cultivos en medio luria depletado de Fe^{++} : A) complejo Pic-hemina (1.5/0.6 mg), B) Pic 1.5 mg y C) Hemina 0.6 mg.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN